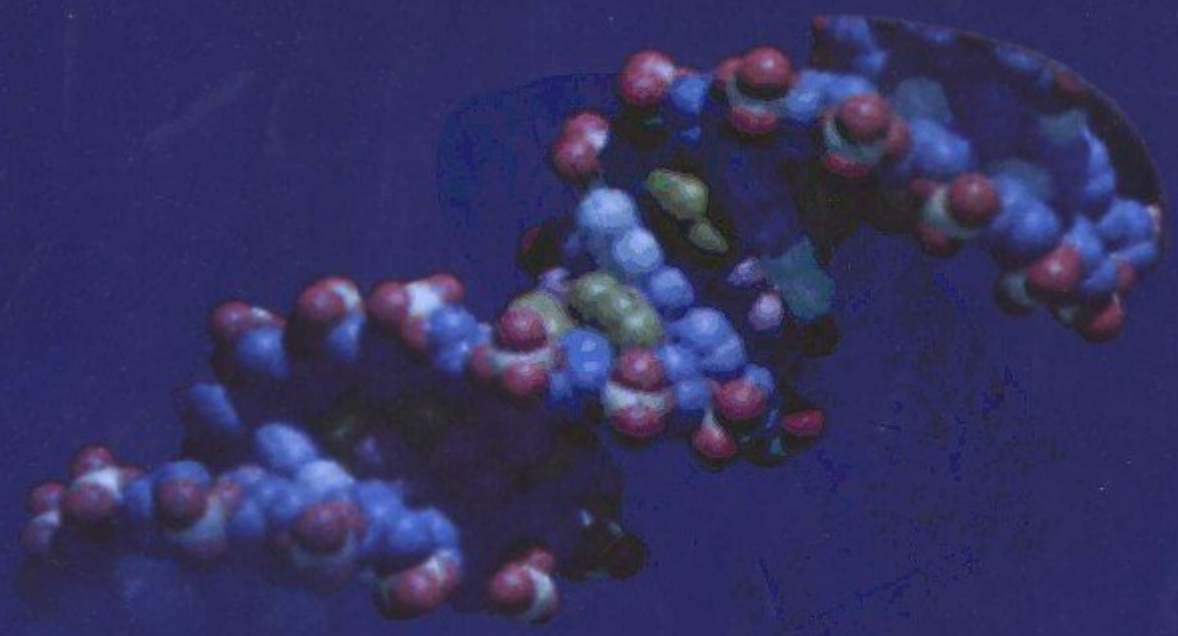
印莉萍　刘祥林　主编

f z x b s w x s y j s

分子细胞生物学实验技术



首都师范大学出版社

分子细胞生物学实验技术

主　编　印莉萍　刘祥林
副主编　祁晓廷　洪剑明　刘维仲

首都师范大学出版社

图书在版编目（CIP）数据

分子细胞生物学实验技术/印莉萍，刘祥林主编．—北京：首都师范大学出版社，2000

ISBN 7-81064-184-0

Ⅰ．分…　Ⅱ．①印…②刘…　Ⅲ．分子生物学：细胞学-实验-教材　Ⅳ．Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字（2000）第 37385 号

FENZI XIBAO SHENGWUXUE SHIYAN JISHU

分子细胞生物学实验技术

责任编辑　俞　斌　封面设计　郑　法

责任印制　胡晓旭　责任校对　王京丽

首都师范大学出版社出版发行

北京西三环北路 105 号

邮政编码 100037

E-mail　cnup @ mail.cnu.edu.cn

网址　www.cnup.cnu.edu.cn

电传　68418523（总编室）　68472512（发行部）

北京首师大印刷厂印制

全国新华书店发行

书号 7-81064-184-0

版次 2001 年 1 月第 1 版

印次 2001 年 1 月第 1 次印刷

开本 787×1092　1/16

印张 21.75

字数 478 千

印数 0,001～1,000 册

定价 39.00 元

版权所有　违者必究

此书为试读版本

THANK YOU!

试读版本有缺页仅供参考，

完整版本请至淘宝店购买。

付费标准百页一元不议价，

按照页数购买读书卡即可。

留言请注书名及收件邮箱，

通常付款三天内邮件发送。

淘宝店址：

http://shop58129009.taobao.com/

邮箱：wenantang@sina.com

QQ：896578748

© postnut.com

前　言

分子细胞生物学实验技术发展迅猛，新方法层出不穷，并广泛应用于教学科研中，有些已经或正在转化为生产力。展望21世纪，它必将为最终解决人类疾病和农业等重大问题发挥主导作用。为了争夺21世纪生物技术的制高点，我国的“863”计划、欧洲的“尤里卡计划”、美国的“面向21世纪的生物技术计划”以及我国当前正在实施的“国家重点基础研究发展规划项目”简称“973”计划都是在竞相聚集和培养人才，以研究和开发生物技术。在为21世纪培养生物技术人才的系统工程中，师范院校和综合性大学同样责无旁贷，本书正是以这样的责任感而努力编辑出版的。

1992年6月我们与医科院基础所联合在首师大生物系举办了“全国分子生物学实验技术研讨班”，并配套编印了相应的实验教学讲义。历经十余轮的研究生必修课、本科生选修课和师资进修班的教学实践，尤其是经过科研应用的检验和两次较大修改，现已能比较系统地介绍当代分子细胞生物学领域中，为培养人才最需要、最常用、也较先进的实验技术和方法。为了能适应今后一段时期高师院校教学科研的需要，本着结合实际略有超前的原则，我们再一次进行补充调整，并编辑成书，作为普通师范院校分子细胞生物学实验教材，也可供农业院校和科研单位相关学科参考使用。

本书具有两个显著特点：(1) 选材的宽广性：将分子和细胞生物学常规的技术和最新发展起来的方法有机地结合起来。参编的30余人分布于14个不同的单位，他们都是科研教学第一线的教师、博士或研究生，都各具相应的技术专长；(2) 易用性：编写上尽力克服以往一些技术专著晦涩难懂、不适合高校学生参照自学的缺点。编写体例适应高校实验教学：实验原理阐述深入浅出，实验步骤清楚明了，结果分析图文并茂，尤其编写者将宝贵的实践经验教训渗透在字里行间，使再用者少走弯路，是一本实用性很强的分子细胞生物学实验教材，可供不同实验基础条件的师范院校和综合性大学的研究生和本科生使用。通过此教材精心培训的学生，将会在分子生物技术领域中具有较强的竞争能力。

本书的主编：印莉萍、刘祥林；副主编：祁晓廷、洪剑明、刘维仲。

参加编写的人员按姓氏笔画排列：

王东（中科院植物所，博士）、王少华、孔冬冬（中科院植物所，博士）、左文倩、印莉萍、白彦霞、祁晓廷、宋秀芳、曲占良（河北大学）、李雷（北京大学，博士）、李艳红、李丹、刘祥林、刘松梅（北京林业大学）、刘维仲（山西师范大学）、刘家熙、吴群英、吴晓强（A&T University，USA）、陈晓红（协和医科大学，博士）、汪洪捷、周海燕、张滨、张承谦、

张勇（清华大学博士）、姚剑虹（复旦大学遗传所）、杨静（首都医科大学）、颜芳（中科院植物所）、洪剑明、柴晓清、晏月明、黄勤妮、温波（中国医学科学院实验动物研究所）、蔡民华。

本书的编写人员虽然各具相应的技术专长，都是教学科研第一线的教师、博士和研究生，但编写过程中的差错和疏漏恐怕慎防不及，敬请同行朋友批评指正，以便进一步完善这本教材。

印莉萍　刘祥林

1999 年 11 月

目　录

1　DNA 的制备和分析 …… (1)

1.1　细菌质粒的制备 …… (2)

1.1.1　碱裂解法 …… (2)

1.1.2　煮沸法 …… (4)

1.1.3　小量一步提取法 …… (4)

1.1.4　DNA 制备试剂盒 …… (5)

1.2　酵母 DNA 的制备 …… (6)

1.2.1　酵母细胞质粒 DNA 的分离 …… (8)

1.2.2　酵母染色体 DNA 的提取 …… (8)

1.2.3　醋酸锂法转化酵母细胞 …… (9)

1.2.4　电击转化酵母细胞 …… (10)

1.3　植物 DNA 的制备 …… (13)

1.3.1　植物细胞核基因组 DNA 的提取与纯化 …… (13)

1.3.2　植物线粒体基因组 DNA 的提取 …… (18)

1.3.3　植物叶绿体基因组 DNA 的提取 …… (21)

1.4　cDNA 文库 λ 重组 DNA 的提取 …… (25)

1.4.1　大量制备 λDNA …… (25)

1.4.2　小量制备 λDNA …… (26)

1.5　质粒 DNA 电镜制样技术 …… (27)

1.6　植物根尖细胞核染色质展层技术 …… (31)

1.7　DNA、RNA 的定量测定及分析 …… (33)

1.7.1　紫外吸收法测定核酸含量 …… (33)

1.7.2　二苯胺显色法测定 DNA 含量 …… (34)

1.7.3　地衣酚显色法测定 RNA 含量 …… (35)

1.7.4　定磷法测定核酸含量 …… (36)

2　DNA 克隆 …… (38)

2.1　DNA 的酶切 …… (41)

2.2　DNA 片段的纯化回收 …… (43)

2.2.1　低熔点胶法 …… (44)

2.2.2　玻璃奶（Glassmilk）法 …… (44)

2.2.3　DNA 回收试剂盒法 …… (44)

2.2.4 冻融法 …… (45)
2.3 DNA 的重组、转化和蓝白筛选 …… (45)
2.4 Southern 印迹杂交 …… (48)
2.4.1 同位素标记探针的分子杂交 …… (49)
2.4.2 DIG 标记探针的分子杂交 …… (51)
2.5 菌落或噬菌斑的原位杂交 …… (55)
2.6 DNA 序列分析 …… (57)
3 RNA 的制备和分析 …… (62)
3.1 植物组织总 RNA 的制备 …… (63)
3.1.1 异硫氰酸胍（GIT）—氯化铯（CsCl）超离心法 …… (63)
3.1.2 异硫氰酸胍—酚法 …… (64)
3.1.3 热酚法 …… (65)
3.2 RNA 的定量和完整性分析 …… (66)
3.2.1 甲醛变性电泳检测 RNA 完整性 …… (66)
3.2.2 紫外分光光度计测定 RNA 含量和纯度 …… (67)
3.3 mRNA 的分离和纯化 …… (69)
3.3.1 Oligo（dT）纤维素亲和层析法 …… (69)
3.3.2 磁珠法 …… (70)
3.4 Northern 印迹杂交 …… (73)
3.5 液体闪烁计测定法 …… (80)
3.6 转录起始位点的测定 …… (82)
3.6.1 核酸酶 S1 保护分析法 …… (82)
3.6.2 RNA 酶保护分析法 …… (85)
3.6.3 引物延伸分析法 …… (86)
3.7 行进转录分析 …… (88)
4 cDNA 文库的构建 …… (92)
4.1 λ ZAP^{Express} cDNA 文库的构建 …… (93)
4.1.1 cDNA 的合成及修饰 …… (95)
4.1.2 体外重组 DNA …… (97)
4.1.3 λ 重组 DNA 的体外包装 …… (97)
4.1.4 λ 噬菌体的转染 …… (98)
4.1.5 体内剪切 …… (98)
4.2 扣除文库的构建 …… (101)
4.2.1 RNA 制备 …… (103)
4.2.2 mRNA 的提取 …… (103)
4.2.3 mRNA 样品的 DNase I 处理 …… (104)
4.2.4 Tester 样品 cDNA 第一链的合成 …… (104)
4.2.5 mRNA 的水解 …… (105)

4.2.6 DNA/RNA 溶液杂交 …… (106)
4.2.7 DNA/RNA 铰链 …… (107)
4.2.8 扣除 cDNA 的克隆 …… (107)
4.3 利用 LD—PCR 合成 cDNA 及 cDNA 文库的构建 …… (109)
4.3.1 cDNA 的合成 …… (112)
4.3.2 cDNA 文库的构建 …… (115)
4.3.3 转变 λTriplEx2 成为 TriplEx2 质粒 …… (117)
5 PCR 相关技术 …… (119)
5.1 PCR 技术 …… (120)
5.1.1 基础 PCR …… (123)
5.1.2 PCR 产物的 TA 克隆 …… (126)
5.1.3 原位 PCR …… (132)
5.1.4 PCR 法筛选 cDNA 文库 …… (136)
5.1.5 再生式序列复制反应（3SR） …… (139)
5.1.6 PCR 快速扩增（RACE）获得全长 cDNA …… (141)
5.2 应用 PCR 技术克隆未知基因 …… (145)
5.2.1 反转录（RT）—PCR …… (150)
5.2.2 差别显示反转录（DDRT）—PCR …… (155)
5.2.3 RNA 的任意引物（RAP）—PCR …… (163)
5.3 分子标记技术 …… (164)
5.3.1 DNA 限制性片段长度多态性（RFLP）分析 …… (166)
5.3.2 随机扩增多态性（RAPD）分析 …… (168)
5.3.3 微卫星 DNA 多态性分析 …… (171)
6 基因表达与调控研究技术 …… (174)
6.1 植物组织培养再生体系的建立 …… (174)
6.1.1 离体器官直接再生不定芽的培养 …… (174)
6.1.2 愈伤组织培养 …… (175)
6.2 植物遗传转化体系的建立 …… (176)
6.2.1 农杆菌介导的转化 …… (177)
6.2.2 基因枪转化技术 …… (179)
6.2.3 电激转化技术 …… (184)
6.2.4 转基因植株的鉴定 …… (185)
6.2.5 外源目标基因在转基因植株中的表达 …… (185)
6.3 Southwestern 法筛选转录因子 cDNA 的克隆 …… (186)
6.4 一步杂交法克隆 DNA 结合蛋白的 cDNA …… (189)
6.5 异源互补法筛选低丰度的基因 …… (193)
6.5.1 cDNA 表达文库的构建 …… (193)
6.5.2 突变型（auxotroph）细胞的转化 …… (193)

6.6 真核细胞的基因在大肠杆菌中的表达 …… (195)
6.7 体外转录和翻译偶联检测法 …… (197)
6.8 凝胶阻滞分析 …… (203)
7 蛋白质的分离与分析 …… (206)
7.1 蛋白质的电泳技术 …… (206)
7.1.1 聚丙烯酰胺凝胶一等电聚焦电泳 …… (206)
7.1.2 蛋白质的双向电泳技术 …… (208)
7.1.3 高效毛细管电泳 …… (212)
7.2 植物同工酶电泳分析技术 …… (217)
7.3 免疫分析技术 …… (220)
7.3.1 免疫血清的制备 …… (220)
7.3.2 酶联免疫吸附测定 …… (224)
7.3.3 双向免疫扩散技术——平板法 …… (227)
7.4 薄层层析技术分离分析氨基酸 …… (230)
7.5 Western—印迹杂交 …… (235)
8 细胞生物学常用技术 …… (243)
8.1 植物细胞质膜的分离和纯化技术 …… (243)
8.2 植物细胞器标记酶的测定 …… (248)
8.3 植物细胞、组织或器官氧化还原活性的测定 …… (250)
8.4 植物原生质体的培养 …… (252)
8.5 植物组织中几种酶的组织化学定位鉴定 …… (255)
8.6 植物激素的提取和鉴定 …… (259)
8.7 放射免疫分析法测定几种激素 …… (261)
8.7.1 血清或血浆孕酮放射免疫测定法 …… (261)
8.7.2 组织中 cAMP 测定法（蛋白结合法） …… (263)
8.7.3 血清雌二醇（Estradiol）的测定 …… (265)
8.7.4 人绒毛膜促性腺激素（HCG）的放免测定 …… (266)
8.8 显微摄影技术 …… (269)
8.8.1 显微摄影装置 …… (269)
8.8.2 感光片的选择与应用 …… (270)
8.8.3 滤光镜的作用 …… (271)
8.8.4 黑白底片的冲洗 …… (271)
8.8.5 黑白照片放大 …… (272)
9 计算机技术在分子生物学中的应用 …… (273)
9.1 国际互联网（Internet）的应用概述 …… (273)
9.2 序列分析软件 …… (275)
9.3 引物评价的计算机软件 …… (278)

9.1 序列数据向数据库的传送 …… (280)
9.3 常用数据库及其软件 …… (282)
9.3.1 BLAST 程序家族所适用的范围 …… (282)
9.3.2 用于 BLAST 程序的数据库 …… (282)
9.3.3 用于分子生物学的免费分析软件 …… (283)
9.3.4 分子生物学中常用的数据库 …… (284)
9.3.5 Internet 上的生物学杂志及其网址 …… (286)
9.3.6 常用的分子生物学网址 …… (287)

附录 …… (289)
附录 1 有关核酸的常用数据 …… (289)
1.1 常用核酸的长度与分子量 …… (289)
1.2 常用核酸与蛋白质换算数据 …… (289)
1.3 DNA 在溶液中的浓度 …… (290)
附录 2 酶类 …… (291)
2.1 溶菌酶 …… (291)
2.2 蛋白水解酶 …… (291)
2.3 无 DNA 酶的 RNA 酶 …… (291)
附录 3 缓冲液 …… (292)
3.1 常用缓冲液 …… (292)
3.2 电泳缓冲液 …… (292)
3.3 常用的凝胶加样缓冲液 …… (293)
3.4 测序凝胶加样缓冲液 …… (294)
附录 4 与 DNA 凝胶电泳有关的数据 …… (295)
4.1 琼脂糖凝胶浓度与线形 DNA 的分辨范围 …… (295)
4.2 聚丙烯酰胺凝胶浓度与线性 DNA 的分辨范围 …… (295)
4.3 染料在非变性聚丙烯酰胺凝胶中的迁移速度 …… (295)
4.4 染料在变性聚丙烯酰胺凝胶中的迁移速度 …… (296)
附录 5 细菌培养基和抗生素 …… (296)
5.1 液体培养基 …… (296)
5.2 含有琼脂或琼脂糖的培养基 …… (298)
5.3 保存培养基 …… (298)
5.4 抗生素 …… (299)
5.5 用于噬菌体操作的溶液 …… (299)
附录 6 杂交实验中用于降低背景的封闭剂 …… (300)
6.1 Denhardt 试剂 …… (300)
6.2 BLOTTO …… (301)
6.3 肝素 …… (301)
6.4 经变性并被打断的鲑精 DNA …… (301)

附录 7　分子生物学有毒试剂的净化处理和安全使用 …… (301)
附录 8　图表目录 …… (303)
附录 9　人类遗传疾病在染色体上的定位 …… (307)
附录 10　酵母遗传学命名法 …… (328)
附录 11　缩略语表 …… (329)

Contents

1 Extraction and Analysis of DNA

1.1 Extraction of plasmid DNA

1.1.1 Lysis by alkaline

1.1.2 Lysis by boiling

1.1.3 Mini-preparation Single step

1.1.4 Plasmid DNA isolation by commercial Kits

1.2 Extraction of yeast DNA

1.2.1 Extraction of plasmid DNA in yeast cell

1.2.2 Extraction of chromosome DNA in yeast

1.2.3 Lithium chloride based protocol for yeast cell transformation

1.2.4 Electroporation based protocol for yeast cell transformation

1.3 DNA extraction from plant

1.3.1 Extraction of genomic DNA from nucleus of plant

1.3.2 Extraction of mitochodria DNA from plant

1.3.3 Extraction of chloroplastic DNA from plant

1.4 Extraction of recombinant lambda DNA from cDNA library

1.4.1 Macro-preparation of λ DNA

1.4.2 Mini-preparation of λ DNA

1.5 Observation of plasmid DNA in electron microscopy (EM)

1.6 Checking chromatin in root tips of plant cell in EM

1.7 Determination and analysis of the amount of nucleic acids

1.7.1 Determination of the amount of nucleic acids by ultraviolet absorption spectra

1.7.2 Determination of the amount of DNA by diphenylamine

1.7.3 Determination of the amount of RNA by 3, 5-dihydro phenmethyl

1.7.4 Determination of the amount of nucleic acids by phosphatomolybdic acid

2 DNA Cloning

2.1 Restriction analysis of DNAs

2.2 Purification and reback of DNA fragment
2.2.1 Low-melted gel method
2.2.2 Glassmilk method
2.2.3 Commercial kits
2.2.4 Freeze-threw method
2.3 Recombination of DNA, transformation and blue/white screening of recombinant
2.4 Southern blotting
2.4.1 Southern blotting with ^{32}P-labelled nucleotivdes
2.4.2 Southern blotting with DIG-labelled probe
2.5 In situ hybridization of bacteriophage plagues or bacterial colonies
2.6 DNA sequencing and analysing
3 Extraction and analysis of RNA
3.1 Extraction of total RNA from plant
3.1.1 Extraction of RNA with guanidinium iso thiocyanate (GIT) by centrifugation in cesium chloride solutions
3.1.2 Extraction of RNA with GIC and phenol
3.1.3 Extraction of RNA with hot phenol
3.2 Quantity and integrity assay of RNA
3.2.1 Electrophoresis of RNA after denature with formaldehyde
3.2.2 The amountand purity of RNA by ultraviolet absorbance spectrium
3.3 Isolation and purification of message RNA from plants
3.3.1 Isolation of poly (A)$^+$ RNA with Oligo (dT) cellulose
3.3.2 Purification of mRNA with PolyAtrac, MegneSphere Kit
3.4 Northern blotting
3.5 Liquid scintillation counting techniques
3.6 Determination of transcription promoter sites
3.6.1 Nuclease S1 protection assay
3.6.2 RNase protection assay
3.6.3 Primer extension assay
3.7 Run—on transcription assay
4 Construction of cDNA libraries
4.1 Construction of cDNA libraries with lamda ZAP^{Express} Kit
4.1.1 Synthesis and modification of cDNA
4.1.2 DNA Recombination in *vitro*
4.1.3 λ phage DNA Packing in *vitro*
4.1.4 λ phage infection of competent bacteria
4.1.5 In *vivo* excising

4.2 Construction of subtractive cDNA libraries
4.2.1 Isolation of RNA
4.2.2 Extraction of mRNA
4.2.3 Preparation of DNA—free mRNA by treatment with DNase I
4.2.4 Single—strand cDNA synthesis of tester
4.2.5 Hydrolysis of mRNA
4.2.6 DNA/RNA solution hybridization
4.2.7 DNA/RNA cross—linking
4.2.8 Cloning of subtractive cDNA
4.3 Construction of cDNA library with LD—PCR
4.3.1 Synthesis of cDNA
4.3.2 Construction of cDNA library
4.3.3 Transform λ Tripl Ex2 into phagmids Tripl Ex2
5 PCR—Related techniques
5.1 Polymerase chain reaction (PCR)
5.1.1 Primary PCR
Addition: Design of degenerate and mutagene primer
5.1.2 TA cloning of PCR products
5.1.3 In situ PCR
5.1.4 Rapid clone screening using PCR from cDNA library
5.1.5 Self—sustained sequence replication reaction (3SR)
5.1.6 Amplifying full—length cDNA by RACE
5.2 Expected gene cloning techniques by PCR
5.2.1 Reverse transcription (RT) —PCR
5.2.2 Differential display (DD) RT—PCR
5.2.3 RNA arbitrarily primed (RAP) —PCR
5.3 Molecular—marker techniques
5.3.1 DNA restriction fragment length polymorphism (RFLP)
5.3.2 Random amplified polymorphism DNAs (RAPD)
5.3.3 Analysis of microsatellite polymorphism using PCR
6 Gene expression and Regulation methodologies
6.1 Establishment of regeneration system of plant tissue culture
6.1.1 Direct regeneration of rootlet from aborgans
6.1.2 Callus culture
6.2 Establishment of plant genetic transformation systems
6.2.1 *Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation of plant gene
6.2.2 Direct DNA transfer into plant tissue via gene gun.
6.2.3 Electrotransformation
6.2.4 Screening and identification of transgenic plants

6.2.5 Expression of the foreign target gene in transgenic plants
6.3 Screening transcription factor cDNA clones by southwestern
6.4 Cloning DNA—BP cDNA by one—hybrid system
6.5 Isolation of low abundant gene by heterogeneous complementation
6.5.1 Construction of cDNA expression library
6.5.2 Transformation of auxotroph cell
6.6 Expression of cloned eukaryotic genes in *Escherichia coli*
6.7 Coupled transcription and translation in *vitro*
6.8 Gel shifting assay
7 Isolation and analysis of protein
7.1 Protein electrophoresis
7.1.1 Isoelectric focusing (IEF) with polyacrylamide gel (PAGE)
7.1.2 Dimensional electrophoresis of protein
7.1.3 Capillary electrophoresis
7.2 Electrophoresis analysis of isoenzymes from plants
7.3 Immune analysis techniques
7.3.1 Preparation of immuneserium
7.3.2 Enzyme—linked—immunosobent assay (ELISA)
7.3.3 Double immunediffusion—plating
7.4 Isolation and analysis of amino acid by superthin chromatography
7.5 Western blotting
8 Commonly cell biological techniques
8.1 Isolation and purification of plasma membrane from plants
8.2 Symbol enzymes determination of plant organelle
8.3 Testing of redox enzyme activity in plant cell, tissue or organs
8.4 Protoplast culture
8.5 Identification of several enzyme by hischemical location in plant tissue
8.6 Extraction and identification of plant hormone
8.7 Determination of hormones by radioimmunoassay
8.7.1 Determination of Xypregnanedione in serum or plasma by radioimmunoassay
8.7.2 Determination of cAMP in tissue by protein—binding
8.7.3 Determination of estradiol in serum by radioimmunoassay
8.7.4 Determination of human chorionic gonadotropin (HCG) by radioimmunoassay
8.8 Microphotography of techniques
8.8.1 Microphotograph installs
8.8.2 Selection and application of the sensitive—light glass
8.8.3 Function of the filter glass
8.8.4 Development of the films

8.8.5 Magnifying the photographs

9 Computer techniques for molecular biology application

9.1 Introduction internet application

9.2 Computer sequence analysis software

9.3 Selecting criteria software for primer

9.4 Transfer to Data Bank from sequence data

9.5 Commonly Databank and software

9.5.1 The application range of blast program

9.5.2 The Databank of BLAST

9.5.3 Analysis software-free for molecular biology

9.5.4 Commonly Databank in molecular biology

9.5.5 Biological magazine addresses in internet

9.5.6 Commonly biological addresses in internet

Appendix

Appendix 1 Commonly used nucleic acids data

1.1 Length and molecular weight of commonly nucleic acids

1.2 Exchange data between nucleic acids and proteins

1.3 DNA content in solution

Appendix 2 Enzymes

2.1 Lysozymes

2.2 Proteolytic enzymes

2.3 DNase—free RNase

Appendix 3 Buffers

3.1 Commonly used buffers

3.2 Electrophoresis buffers

3.3 Commonly used loading buffer

3.4 Sequencing loading buffers

Appendix 4 Date for DNA electrophoresis gels

4.1 The distinguish range between concentration of agarose gel and line—DNA

4.2 The distinguish range between concentration of PAGE gel and line—DNA

4.3 Migrating speed of dyes in natural PAGE gel

4.4 Migrating speed of dyes in denatural PAGE gel

Appendix 5 Bacterial media and antibiotic

5.1 Liquid Media

5.2 Media containing agar or agarose
5.3 Storage media
5.4 Antibiotic
5.5 Solution for working with λ bacteriophage

Appendix 6 Blocking agents for lowing background in hybridization

6.1 Denhardt
6.2 BLOTTO
6.3 Heparin
6.4 Denatured, fragmented salmon sperm DNA

Appendix 7 Treatment and safety for drugs decontamination in molecular biology

Appendix 8 Contents for figures and tables

Appendix 9 Human genetic disorders located the chromosomes

Appendix 10 Yeast genetic nomenclature

Appendix 11 Abbreviations

1

DNA 的制备和分析

核酸是生物遗传信息的携带者，在生物体内决定着蛋白质的生物合成，具有极为重要的生理功能。生物体的 DNA 主要包括染色体 DNA（核基因组）、线粒体 DNA（mtDNA）、叶绿体 DNA（cpDNA）、噬菌体 DNA 和质粒 DNA 等。高纯度、完整性好的基因组 DNA 对分子生物学研究非常重要，因此研究 DNA 的提取方法极为有意义。

DNA 通常与蛋白质及部分 RNA 结合成染色体存在，因此分离核酸首先要破碎细胞，然后采用各种方法将 DNA 中的蛋白质、糖类、脂类和盐类等物质除去以纯化 DNA。在提取过程中，要保证 DNA 不被内源或外界污染的 DNase 降解以保持 DNA 的完整性，并要排除其它分子的污染。

DNA 的一般提取方法可归纳如下：

1. 生物材料的选择

包括动物、植物、微生物，主要考虑生长状态或生长期，不同的组织或器官，样品取材的难易及丰富程度。

2. 细胞的破碎（在缓冲液中）

机械法：组织捣碎机、玻璃匀浆器、研钵研磨。

物理法：反复冻融法（－15℃～20℃，主要用于动物细胞）、冷热交替法（90℃～冰冻，主要用于细菌病毒）、超声波处理法（多用于微生物）。

化学及生化法：自溶法（在一定的条件下加防腐剂，自身酶系破坏细胞，因时间长不易控制，一般不用）、溶菌酶（破坏细菌细胞壁）、纤维素酶（用在植物细胞上）、表面活性剂（SDS 和 TritonX－100 等）。

3. 细胞器的分离

提取细胞的线粒体和叶绿体 DNA，首先应分离出线粒体和叶绿体，一般采取在适当介质中的差速离心法分离。

4. DNA 的提取

一般采用酚/氯仿去除蛋白质，用高盐除去糖类，用去污剂如 SDS、CTAB 等溶解细胞膜，使蛋白变性，抑制 DNase 活性，最后用乙醇或异丙醇沉淀 DNA。

5. DNA 的纯化

无论采用哪种方法提取 DNA，都有不同程度的蛋白质、多糖以及一些盐类污染，因此进一步纯化 DNA 是非常必要的。常用的方法有有机溶剂抽提、沉淀、柱层析法、梯度离心法、用酶温和消化杂质等。

1.1 细菌质粒的制备

质粒是染色体外能独立遗传的共价闭合双链 DNA 分子，它存在于细菌和其它一些生物体内，能够提供给宿主细胞一些表型如抗药性、分解复杂有机物的能力。野生质粒经过改造后可以作为基因工程的载体，这种基因载体工具在基因工程中具有极广泛的应用价值。因此质粒的分离与提取是最常用、最基本的实验技术。

细菌质粒是最常用的基因工程载体，它的提取可以分为以下三步：细菌培养物的生长，细菌的收集和裂解，质粒 DNA 的纯化。细菌培养物是通过在含有适当浓度的抗生素的液体培养基中接种一含有所提质粒的宿主菌的单菌落，37℃下 150～250rpm 摇培过夜即可获得。对松弛型的质粒，可以在细菌生长的对数后期加入氯霉素抑制宿主菌蛋白的合成和染色体 DNA 的复制来增加拷贝数。细菌的收集可以采用离心的方法，为了防止细菌排除的代谢废物影响质粒的纯度，可以用液体培养基或生理盐水洗 1～2 次。细胞裂解的方法很多，如去污剂法、煮沸法、碱变性法等。这些方法各有利弊，要根据质粒的性质、宿主菌的特性及后续的纯化方法等多种因素加以选择。粗提质粒为了满足一些实验的要求还需要进一步纯化，氯化铯－溴化乙锭密度梯度离心纯化质粒 DNA 是可靠经典的方法。

细菌质粒的提取常采用碱裂解法、煮沸法、一步提取法等。碱裂解法利用宿主菌线状染色体 DNA 与闭环双链质粒 DNA 的结构状态的差异来提取质粒 DNA。当同时变性时，线状 DNA 变性充分而质粒 DNA 处于拓扑缠绕的自然状态而不能彼此分开。当条件恢复时（酸中和），质粒 DNA 迅速准确配置重新形成完全天然超螺旋分子，而线状 DNA 则交联变成不溶于水的线团状结构，附在细胞碎片上一起被离心除去。煮沸法利用高温破坏细菌细胞，同时利用溶菌酶酶解细菌细胞。小量一步提取法是直接将细菌培养物和酚/氯仿混合，同时完成细胞裂解、蛋白变性两个过程。

1.1.1 碱裂解法

材料、试剂和仪器

1. 材料

含有质粒的菌种

2. 试剂

溶液 I：

50mmol/L 葡萄糖

25mmol/L Tris·HCl（pH8.0）

10mmol/L EDTA

高压灭菌 15min，4℃贮存。

注：溶液Ⅰ可以用 TE 代替。

溶液Ⅱ：新鲜配制

0.2mol/L NaOH（用 5mol/L NaOH 母液配）

1% SDS（用 10% SDS 母液配）

注：此处可以用 0.4mol/L NaOH 和 2% SDS 的母液等体积混合即可。

溶液Ⅲ：

5mol/L KAc 60 mL

冰乙酸 11.5 mL

ddH_2O 28.5mL

注：溶液也可以用 3mol/L KAc 代替。

3. 仪器

恒温摇床，台式离心机，低温冰冻离心机，制冰机，电泳装置，便携式紫外灯。

实验程序

1. 小量提取法

（1）在含有抗生素的 LB 培养基中接种一单菌落，37℃150rpm 摇培过夜。

（2）取 1.5mL 菌液于小离心管中，室温 12 000rpm 离心 5min 收集菌体，弃去上清。加入 100μl 冰预冷的溶液Ⅰ，剧烈振荡直至悬液发稠。

（3）加入 200μl 新配制的溶液Ⅱ，快速颠倒 5 次，置冰上。

（4）加入 150μl 用冰预冷的溶液Ⅲ，温和振荡 10s，置冰上 5min。

（5）12 000rpm，离心 10min，转上清于另一管中，用等体积的酚/氯仿抽提一次，1 000rpm 离心 2min，吸上清于另一管中。加入 2 倍体积 100%乙醇，−20℃沉淀 1hr。

（6）琼脂糖凝胶电泳检测质粒的完整性。若需要可以进一步纯化质粒 DNA 以达到转化、重组的要求。

2. 大量提取法

（1）在含有抗生素的 30mL LB 培养基中接种一单菌落，37℃150rpm 摇培至对数晚期，然后转到 500mL 的 LB 培养基中剧烈摇培过夜，此时也可以加入氯霉素以增加质粒的拷贝数。

（2）取 500mL 菌液于离心管中，4 000rpm 离心 15min 收集菌体，弃去上清，重悬于 10mL 冰预冷的溶液Ⅰ中。

（3）加 1mL 新配制的溶菌酶溶液（10mg/mL，溶于 10mmol/L Tris·HCl，pH 8.0）。

（4）加入 20mL 新配制的溶液Ⅱ，盖紧盖子，缓缓颠倒离心管数次，以充分混匀内容物。于室温放置 5～10min。此时溶液发稠。

（5）加入 15mL 冰预冷的溶液Ⅲ，温和振荡数次，置冰上 10min。此时溶液出现白色沉淀。

（6）4 000rpm，离心 10min，转上清于另一管中，用等体积的酚/氯仿抽提一次，1 000rpm 离心 2min，吸上清于另一管中。加入 0.6 倍体积异丙醇混匀，室温沉淀 10 min。

（7）5 000 rpm 离心 15 min 回收质粒 DNA。70%乙醇洗一次后，空气中干燥。加适量的无菌水或 TE 溶解。

（8）琼脂糖凝胶电泳检测质粒的完整性。若需要可以进一步纯化质粒 DNA 以达到转化、重组的要求。

注：小量提取往往不能满足大量分析需要，可以用“中量提取法”即 50 mL 菌液用 2 mL 溶液Ⅰ，4 mL 溶液Ⅱ和 3 mL 溶液Ⅲ处理后直接用等体积的氯仿抽提，然后分装小离心管沉淀分析用。这样即节省时间又便于分析。

1.1.2 煮沸法

材料、试剂和仪器

1. 材料

适合煮沸法提取质粒的细菌（如含有 endA⁻的菌株不适宜用此法）

2. 试剂

（1）STET：0.1mol/L NaCl，10mmol/L Tris·HCl（pH 8.0）
1mmol/L EDTA（pH 8.0），5% Triton X-100

（2）溶菌酶 10mg/mL（溶于 10mmol/L Tris·HCl pH 8.0，新鲜配制）

（3）RNaseA 10mg/mL

（4）异丙醇

（5）70%乙醇

（6）TE

3. 仪器

离心机，制冰机，水浴锅，电泳装置，便携式紫外灯

实验程序

（1）离心收集的细菌用 350μl STET 悬浮。

（2）加入 25μl 新鲜配制的溶菌酶液，混匀。煮沸 40s。

（3）室温下，12 000g 离心 10min。

（4）转上清于另一管中或用灭菌牙签挑出沉淀物，上清中加入 40（μl）2.5mol/L NaCl（pH 5.2）和 420μl 的异丙醇，振荡混匀，室温下放置 5min。

（5）4℃，12 000g，离心 5min。

（6）弃上清，加入 1mL 70%乙醇洗一次。吹干，加入 50（μl）TE 溶解。

1.1.3 小量一步提取法

本法首先由 Kamal Chowdhury 于 1991 年报道的。其原理是直接将细菌培养物和酚/氯仿混合，同时完成细胞裂解、蛋白变性两个过程，然后离心除去大部分细胞核 DNA 与蛋白质，含质粒 DNA 的上清用异丙醇沉淀。其优点是操作简单、方便、经济，特别适合大量质粒的快速分析。

材料、试剂

1. 材料

含质粒的细菌

2. 试剂

（1）PCI：酚/氯仿/异戊醇（25∶24∶1），其中酚用 TE（10mmol/L Tris·HCl pH 7.5，1mmol/L EDTA）饱和。

（2）TER：TE，pH 7.5，含 RNase 20μg/mL

实验程序

（1）取 0.5mL 细菌过夜培养物，置 1.5mL Ep 管中。

（2）加入 0.5mL PCI，用振荡器最大速度振荡 1min，充分混匀。

（3）4℃，12 000 g 离心 5min，取上清 0.45mL 左右，移至另一个 Ep 管中，加 0.5mL 异丙醇（不加盐也无需冷冻）混匀，马上 12 000g，离心 5min。弃上清，用 70%乙醇洗一次，空气中干燥，加 100μl TER 溶解 DNA。取 5～10μl 电泳分析。

1.1.4 DNA 制备试剂盒

材料、试剂和仪器

1. 试剂

（1）Wizard Plus SV Minipreps DNA 纯化系统

（2）重悬液

（3）裂解液

（4）碱性蛋白酶液

（5）中和液

（6）洗脱液

（7）在应用新的 Wizard Plus SV Minipreps DNA 纯化系统前，先依照下列程序稀释洗脱液（Wash Solution）

①加入 35mL95%的乙醇至终体积 55 mL（50 次反应系统）；

②加入 170mL95%的乙醇至终体积 270 mL（250 次反应系统）。

实验程序

（1）将 1～10 mL 细菌培养液 10 000g 离心 5min，去上清。

（2）加入 250μl 细胞重悬液，涡旋使细胞完全悬浮。

（3）加入 250μl 细胞裂解液，颠倒试管 4 次使之混合（不要涡旋）。观察到悬浮液澄清以确保裂解充分。

（4）加入 10μl 碱性蛋白酶液，颠倒试管 4 次使之混合。室温静置 5min。

（5）加入 350μl 中和液，颠倒试管 4 次使之混合。

（6）裂解液室温 14 000g 离心 10min。

（7）先将自旋柱插入收集管中，再将上清（约 850μl）装入柱中。

（8）室温 14 000g 离心 1min，取下柱子，倒去收集管中的流出液。

（9）加 750μl 洗脱液于柱中。

（10）室温 14 000g 离心 1min，取下柱子，倒去收集管中的流出液。

（11）加 250μl 洗脱液于柱中。

（12）室温 14 000g 离心 2min。

（13）将柱子置于一个灭过菌的 1.5mL 试管上。

（14）柱中加入 100μl 去核酸酶水，室温 14 000g 离心 1min 洗脱质粒 DNA。

结果分析

通过琼脂糖凝胶电泳检测所提质粒的完整性。电泳后经 EB 染色后在紫外光下可以看到三条质粒带型，根据电泳的快慢由（－）到（＋）分别为开环（OC）、线状（L）和超螺旋（SC）三种形式。根据其中线状条带的位置可以估算质粒的分子量。

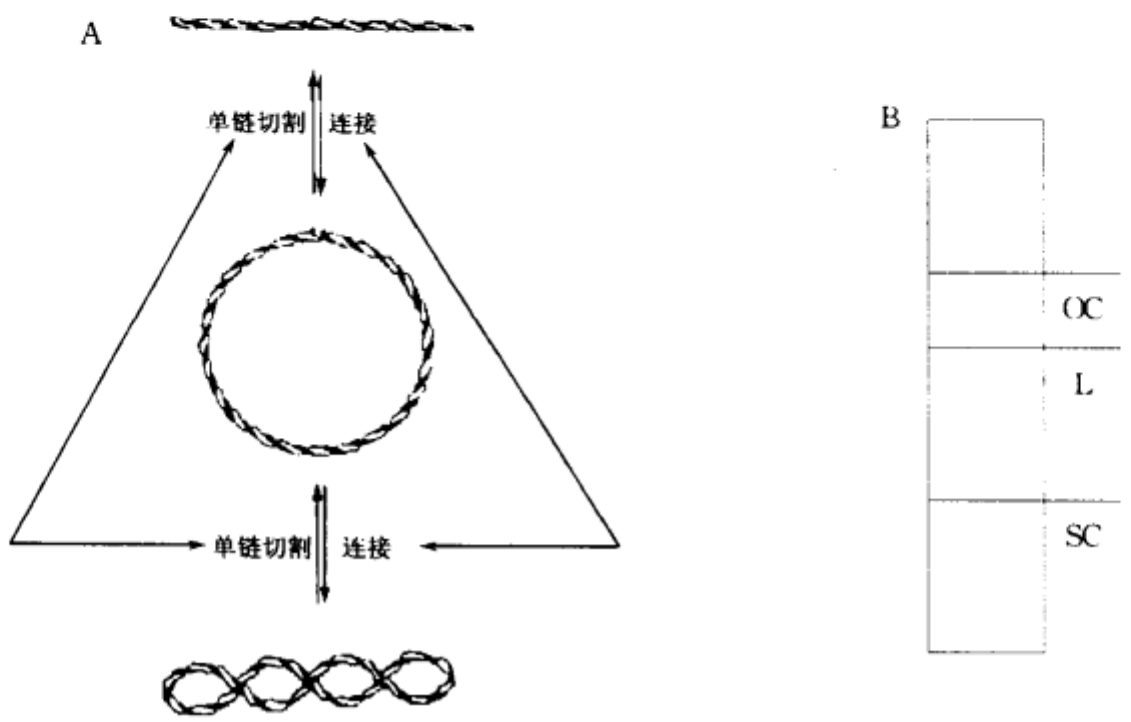


图 1.1　质粒 DNA 的分子构型（A）及琼脂糖凝胶电泳图示（B）

SC：超螺旋状 DNA　L：线状 DNA　OC：开环状 DNA

思考题

1. 提取质粒的一般原理是什么？
2. 不同的提取方法的优缺点如何？

参考文献

1. 黄翠芬，1987，遗传工程理论与方法．科学出版社 168～170

2. Davis，V，G，et al. 1986. *Basic Methods in Molecular Biology*. Science Publishing Co，Inc，New York

3. 卢圣栋，1993，现代分子生物学实验技术．高等教育出版社 105～117

（祁晓廷　刘祥林）

1.2　酵母 DNA 的制备

酿酒酵母（saccharomyces serevisiae），一直被称为真核生物中的“大肠杆菌”。遗传学工作者对酵母菌进行了广泛的研究，EUROFAN（Europen Functioned Analysis Network）已于 1996 年 4 月 24 日完成了酵母基因组测序。这是第一个完成的真核生物完整基因组，共有6 500 个基因。酵母菌与其他微生物一样易于培养，且它的单倍体核酸 DNA 容量仅为大肠杆菌基因

组的 3.5 倍，亦比较简单。然而，尽管酵母菌基因组很小，但它的许多生物学特性与真核生物相似。酵母菌是研究遗传学和分子生物学的一个有力工具，如果将它与真核生物的一系列基本的分子生物学问题结合起来，可以说酵母菌就是研究真核生物生命现象的首选工具。

培养酵母菌即简单、经济，又十分快捷，在营养丰富的培养基中，大约 90min 的时间即可增殖一代。由于酵母菌可在成分明确的培养基中生长，因此已分离到大量的营养缺陷型酵母菌株，这不仅可以研究酵母菌复杂的代谢途径，而且还可以提供许多有利于遗传学分析的突变体。

单倍体酵母细胞基因组为 15Mb 的、含 16 条大小约为 200～2200kb 的线性染色体。相比较而言，最大的酵母染色体仍然比哺乳动物染色体小约 100 倍左右。支持酵母菌染色体功能的三种基本结构元件已经被确认和克隆，它们分别是：复制起点（ARS 元件）、着丝粒（CEN 元件）和端粒（TEL 元件）。利用这些克隆化的元件已经构建了酵母人工染色体 YAC 载体，并应用于各种染色体行为的研究。利用这些结构元件，再加上克隆化的酵母菌选择标记与大肠杆菌载体融合构建成穿梭载体，它们能分别在大肠杆菌和酵母菌中自主复制和稳定存在。

大多数酵母载体都是能穿梭于酵母和细菌之间的穿梭载体。根据不同用途，可分为克隆载体、表达载体、转导载体和用于诱变的载体（见表 1－1）。根据复制方式，酵母载体也可分为两类：一类是整合载体，这种载体在酵母中不能自我复制，只能通过同源重组整合至染色体中而 得以保存。这类载体的优点是一个基因一旦被克隆和整合之后，将随染色体 DNA 而分离，因此该基因在细胞分裂时会更稳定。另一类载体，它包括酵母着丝点序列，一般在克隆

表 1－1 常用的酵母载体

载体		启动子	选择标记	原型	应用
表达载体	pSM1/2	SV40	Amp/LEU2	pDB248	构建
	pEVP11	adh	Amp/LEU2	YEp13	构建
	pART1	adh	Amp/LEU2	pIRT2	构建
	pMB322	adh	Amp/URA3	pFL20	构建
	pCHY21	fbp	Amp/URA3	pFL20	诱导
	pREP1	nmt1	Amp/LEU2	pUC119	诱导
	pPIP1/s	nmt1	Amp/LEU2	pUC119	诱导及整合
克隆载体	pDB262		TC/LEU2	2μ	基因库
	pWH5		Tc，Amp/LEU2	2μ	基因库
	pON163		Amp，Km/ura4	ars1＋	基因库
	pDB248		Tc，Amp/LEU2	2μ	各种目的
	pFL20		Tc，Amp/URA3	ars1＋	基因库
	YEp13		Amp/LEU2	2μ	各种目的
	pIRT2		Amp/LEU2	ars1＋	各种目的
	pIRT2V		Amp/Ura4	ars1＋	各种目的
	pURA4		Amp/Ura4	ars6＋	各种目的
	pSTA12		Amp/sup3－5	pMB1	整合
用于突变的载体	PCRR1		Tc/LEU2	Ars	诱发突变
转导载体	PAL19		Tc/LEU2	Ars	共转染
	PAU21		Tc/URA3	Ars	共转染

时作为一个 CEN/ARS 盒。这类载体同时具有自我复制能力并且在细胞分裂时较稳定。

表达载体：表达载体能通过把感兴趣的 cDNA 与特殊启动子相融合而使之表达。病毒 SV40 早期启动子在裂殖酵母中具有活性。该启动子能在相对较低水平上自发表达。

尽管酵母菌的基因组比较小，但酵母菌是一种典型的真核生物。它不仅含有高等真核生物细胞中有膜的亚细胞器，而且还有细胞骨架。酵母 DNA 只在核内存在，尽管无组蛋白 H1，但染色体 DNA 的核小体结构与高等真核生物仍十分相似。酵母菌 DNA 的转录由三种不同的 RNA 聚合酶完成，只有很少的基因出现内含子，mRNA（由 RNA 聚合酶Ⅱ转录）具有真核生物 mRNA 典型的转录后修饰［如 5′端加甲基化的鸟嘧啶帽（methyl－G）和 3′端加 poly（A）尾］。在酵母菌中已有几种经充分研究的分泌型蛋白和外激素的基因，表明蛋白加工是一个相当复杂的过程。总之，酵母是一种最简单的典型真核生物，它良好的遗传背景，使之成为进行真核生物的基因操作的常用研究工具并提供了大量可借鉴的经验。

1.2.1 酵母细胞质粒 DNA 的分离

材料和试剂

（1）YPD 或选择培养基

（2）含目的质粒的酵母菌落

（3）溶菌缓冲液：100 mmol/L Tris；30 mmol/L EDTA；0.5% SDS

（4）酚/氯仿/异戊醇（25∶24∶1）

（5）0.45～0.52 mm 酸洗玻璃珠（Thomas Scientific）

（6）TE 缓冲液

（7）无水乙醇，70%乙醇

实验程序

（1）在无菌玻璃试管中加入 2 mL 带有抗生素的培养基，接种含有带目的基因质粒的单菌落，在摇动培养箱中 30 ℃ 过夜。

（2）将菌液倒入微量离心管中，室温高速离心 5 s，弃上清，快速振荡分散沉淀物。

（3）酵母细胞用 200 μl 溶菌缓冲液重悬，加入 0.3 g 玻璃珠（约 200 μl 体积）及 200 μl 酚/氯仿/异戊醇，在旋涡混合器上高速振荡 2 min，室温高速离心 5 min。

（4）水相即含质粒，一方面可按常规用乙醇沉淀质粒；另一方面也可直接取 1～2 μl 水相转化大肠杆菌。

1.2.2 酵母染色体 DNA 的提取

材料和试剂

（1）1 mg/mL RNase A

（2）4 mol/L 乙酸铵溶液或 3mol/L 乙酸钾（KAc）

实验程序

（1）在无菌三角瓶中加入 10 mL 培养液，接种 30 ℃，过夜培养。

(2) 室温下 5 000rpm 离心 5 min，弃上清。

(3) 细胞用 100 μl 溶菌缓冲液重悬，快速涡旋振荡分散菌体沉淀，沸水浴 15min。

(4) 加 100 μl 2.5 mol/L KAc，冰上放置 1 hr。

(5) 13 000rpm，4℃下离心 5min，上清液转移至一个新试管中，加 100 μl 酚/氯仿/异戊醇，在旋涡混合器上高速震荡 3 min。

(6) 室温下高速离心 3 min，取上清，加 30 μl 的 1 mg/mL RNase A，混合 37 ℃ 温育 5 min。

(7) 加 100 μl 氯仿/异戊醇，混匀。13 000 rpm 离心 3min，将上清液移至另一个新试管中。

(8) 加 1 mL 冷的异丙醇，－20℃放置 10min。

(9) 15 000rpm 离心 15min，弃上清。

(10) 加 1mL 70% 乙醇，13 000rpm 离心 10 min。

(11) 弃上清，干燥沉淀，DNA 用 100 μl TE 缓冲液重悬。

10mL 菌液大约可以得到 20 μg 的染色体 DNA，可用于限制性酶切，体外 PCR 扩增 或 Southern 分析，对于 Southern 杂交，当用 5 μl DNA (约 1 μg) 在 20 μl 总体积下消化时可以得到最佳效果。PCR 扩增时，则在 50 μl 反应体系中用 2 μl DNA。

1.2.3 醋酸锂法转化酵母细胞

材料、试剂和仪器

1. 试剂

(1) 0.1 mol/L 醋酸锂溶液，pH 4.9

(2) 50% PEG－4000

(3) MB 培养基

2. 仪器

超净台，离心机，制冰机，水浴摇床，电泳装置，便携式紫外灯，涡旋仪

实验程序

1. 感受态细胞制备

(1) 将生长活跃的酵母培养菌接种到加有适当氨基酸的 100mL MB 培养基中，在 2 升锥形瓶中于 32℃摇培，令其生长至密度为 0.5×10^7/mL 细胞。

(2) 离心 (1 000g，5 min) 收集细胞，水洗两次后悬浮于 0.1 mol/L 醋酸锂溶液 (约 1/5 体积，即 20mL)。

(3) 置悬浮液于 30 ℃水浴轻摇培养 30min。

(4) 再次离心收集细胞，重悬于 0.1mol/L 醋酸锂中使细胞浓度为 1×10^9/mL 细胞。

(5) 加入等体积 10% DMSO 后，以每份 200μl 分装，贮存于 －80℃冰箱中。

2. 转化

(1) 于 0.1mL 新制或解冻的感受态细胞中加入 15μl DNA (溶于含 0.1mmol/L EDTA 的 10mmol/L Tris·HCl pH7.5 中或 TE 缓冲液中)。将此细胞/DNA 混合物轻缓地混匀，在 30℃下培养 60min。

（2）将培养物轻缓地振荡以使细胞重悬，加入 290μl50%（W/V，溶于水）PEG-4000（事先预温到 30℃），缓慢振荡使之混匀。

（3）30℃再培养 60min。

（4）42℃ 热休克处理 15min。

（5）冷却至室温，5 000g 离心 2min 以沉淀细胞。

（6）将细胞重新悬浮于 1mL 0.25%的细菌－酵母提取物中（内含 1.5%葡萄糖和适量氨基酸），将此悬液转入内含 9mL 上述培养基的 200mL 锥形瓶中。

（7）30℃下剧烈振荡，培养 30～60min。取出部分转化细胞液展铺在 MB 平板上，于 30℃培养 4～7 天。

思考题

1. 比较细菌质粒提取与酵母质粒提取方法的不同。
2. 酵母染色体 DNA 与质粒 DNA 提取时是如何分开的？
3. 何谓穿梭载体，并解释其原理。

参考文献

1. Yongming Li and Yiqi Zhao 1996 *Proctical protocols in Molecular Biology*. Science Press Beijing, New York 21～23; 63～64

2. 奥斯伯等，1998，精编分子生物学实验指南，科学出版社 522～523

3. 王岳五等，1993，实用重组 DNA 技术，天津科学技术出版社 211～212

4. [美] A. 亚当斯等，酵母遗传学方法实验指南，科学出版社

（王少华 颜 芳）

1.2.4 电击转化酵母细胞

所有溶液和酵母细胞接触的玻璃器皿必须是无菌的。在玻璃器皿上任何痕量的去污剂都可降低转化的效率。另外，用于配液和清洗玻璃器皿的水必须具有很高的纯度方可满足转化的要求。

材料、试剂和仪器

1. 试剂

（1）YPD medium

20g/L 细菌蛋白胨

10g/L 酵母提取物

20g/L D-葡萄糖（另加）

20g/L 琼脂糖（固体再加）

加 ddH_2O 至 950mL，调 pH 值至 5.8，高温灭菌。待温度降至 55℃时，加入 50mL 无菌的 40% D-葡萄糖贮液。

（2）1 mol/L D-山梨醇和 1.5mol/L D-山梨醇

山梨醇选择平板

在高压灭菌前，将山梨醇粉补加到 CM 省却成份平板培养基中至终浓度为 1 mol/L。

注：补加山梨醇后使琼脂更粘，高压灭菌时更易沸腾溢出。

(3) CM 省却营养成分的极限培养基

6.7g/L Yeast nitrogen base without amino acids

20g/L Agar

加蒸馏水至 850mL，调 pH 值至 5.8，高温灭菌。待温度降至 55 C 时，加入 100mL 无菌的 10X dropout solution 和 50mL 无菌的 40%葡萄糖贮液。

(4) 10X Dropout Solution (高温灭菌后，可在 4 C 保存一年)

L-Isoleucine	300mg/L
L-Valine	1500mg/L
L-Adenine hemisulfate salt	200mg/L
L-Arginine HCl	200mg/L
L-Histidine HCl Monohydrate	200mg/L
L-Leucine	1000mg/L
L-Lysine HCl	300mg/L
L-Methionine	200mg/L
L-Phenylalanine	500mg/L
L-Threonine	2000mg/L
L-Tryptophan	200mg/L
L-Tyrosine	300mg/L
L-Uracil	200mg/L

(5) 水，高质量且无菌

洗涤和溶液制备的水必须具有尽可能高的质量 (MilliQ)；电导至少应 10MΩ/cm。高压灭菌并于室温保存。

(6) 待转化的酵母菌株

(7) 转化用 DNA

2. 仪器

恒温旋转平台培养箱，高速离心机，电穿孔仪

EQUIBIO 公司的带脉冲控制器和 2mm 间隙的一次性电击池 (用时于冰浴中预冷)。

实验程序

1. 感受态细胞的制备

(1) 实验前两天，将转化酵母菌株的单菌落接种于盛有 20mL YPD 培养基的 100mL 锥形瓶中，29 C，300 rpm 培养 24hr。

(2) 测 OD_{600}，在装有 500mL YPD 培养基的 2L 无菌烧瓶中接种适量的过夜培养液，于 29 C 剧烈摇动培养过夜，使 $OD_{600}=1.0\sim2.0$ (细胞密度达到 1×10^7 细胞/mL)。

(3) 4 C，2 500g 离心 5 min，收获培养细胞。

(4) 用 0.5 倍体积的冰预冷无菌的 1.5mol/L 的山黎醇重悬细胞，4 C，2 500g 离心 5min。

(5) 用 0.5 倍体积的冰预冷无菌的 1.0mol/L 的山黎醇重悬细胞，4 C，2 500g 离心 5min。

(6) 细胞用 0.5 倍体积的冰预冷无菌的 1.0mol/L 的山黎醇洗涤 2 次，0.1 倍体积的冰预冷无菌的 1.0mol/L 的山黎醇洗涤 1 次。

(7) 用适当体积的洗液重悬细胞，使细胞密度达到 1×10^9。

2. 电击转化

（1）往一个无菌、冰冷的 1.5mL 离心管中加入 40μl 浓缩的酵母细胞和 1ng～1μg DNA（100ng 最合适），稍离心，混匀，冰上放置 3min。

（2）转移混合物至一个冰预冷的 2mm 间隙的一次性电击池中（DAN 的质量大大影响转化效率）。

（3）快速转移杯子至电击池中，立刻脉冲转化。

杯子	2mm
电压	450V
电容	150μF
电导	99R

（4）尽快（30s 内）往杯子中加入 1mL YPD 培养基，重悬细胞，温育 1 hr。

（5）将 50～100μl 酵母菌液涂布到选择平板上（通常电击转化后菌落形成比传统的转化方法时间长），30℃培养 3～6 天。

3. 仪器操作

（1）为了安全，首先要在电击仪上连接一根地线。

（2）用电压选择开关选择所需电

（3）打开电击仪后面的电源开关，仪器内部电压自动调整到外接电压（94V－250V），同时位于仪器正前方 start 键下的绿灯亮。

（4）把安全帽放到电击池上，绿灯“SAFETY OK”亮。

（5）按下 start 键，脉冲开始。红灯“CHARGEING”亮，大约 13 秒后脉冲消失。同时会听见鸣声，绿灯 LED“PULSE OK”亮。此时，系统已正常，可立刻使用。

（6）把电击用小杯子放于电击池中，盖上盖子，按下 start 键，开始脉冲。

注：

（1）感受态细胞的制备：培养细胞的器皿必须无菌，水必须高质量，当细胞 OD 值达到 0.4 左右时，尽快降温。

（2）DNA 质量：DNA 最好去盐，纯化。

（3）时间和温度：细胞制备和转化过程应在冰温下快速进行。

（4）电转后：电击转化后的细胞必须在脉冲 30s 内转移到生长培养基中。

（5）水：最好用新鲜的 18MΩ 贮存于无去污剂的干净器皿或一次性器皿中。

（6）化学试剂的纯度：所有化学试剂必须有利于细胞培养和制备且为分子生物学试剂。

思考题

为什么电击法对质粒 DNA 纯度的要求比醋酸锂法高？

参考文献

1. F. 奥斯伯，R. E. 金斯顿，J. G. 塞得曼等著，1998，精编分子生物学指南，科学出版社

2. EQUIBIO 公司电击仪使用说明书

（王少华　宋秀芳）

1.3 植物 DNA 的制备

1.3.1 植物细胞核基因组 DNA 的提取与纯化

植物细胞中具有三个独立的基因组——核基因组、叶绿体基因组和线粒体基因组。在这三个基因组中，叶绿体基因组和线粒体基因组未能编码其细胞器本身发育所需的所有蛋白，所以还受控于核基因，可见核基因组在细胞发育过程中起着举足轻重的作用。

植物核基因组一般比动物的基因组大，每单倍体在 $10^8 \sim 10^{11}$ 核苷酸之间变动。植物核 DNA 具有单拷贝、低重复、中等重复和高重复四种序列形式。它与组蛋白和其它一些非组蛋白聚在一起从而形成染色质。在植物细胞中，核基因组的 DNA 含量和编码基因数目都是最多的。核 DNA 的含量因植物种类和倍性不同而变化极大。核 DNA 不仅要编码植物细胞中其它各个发育过程所需的蛋白，而且也要编码核 DNA 自身的转录翻译等过程所需要的蛋白。

到目前为止，克隆出的许多植物基因都是多基因家族的成员，因而研究并分离的植物核基因难以计数，但总体上可分为以下几类：核蛋白体基因和组蛋白基因、光合基因（与光合作用相关）、贮存蛋白基因（与种子萌发等发育过程相关）、糖代谢基因（参与糖代谢过程）、氮代谢基因（参与氮代谢过程）、脂肪代谢基因（参与脂肪代谢过程）、生长发育调控基因（与发育过程相关）、逆境反应基因（与环境刺激应答相关）、膜蛋白基因（参与膜的组成）、转录翻译相关基因、细胞骨架基因等。这些基因的表达概括了植物生长发育的全过程。部分已分离出的植物核基因如下表：

表 1—2 植物核基因组部分基因及染色体定位

基因名称	染色体定位
Ⅰ. 核蛋白体和组蛋白基因 rRNA 基因 tRNA 基因 r 蛋白基因 组蛋白基因	
Ⅱ. 光合基因 Rubisco 小亚基基因	番茄：染色体 2、3；豌豆：染色体 5；小麦：2As、2Bs、2Ds
叶绿素 a/b 结合蛋白基因	番茄：染色体 12
果糖－1，6－二磷酸酶基因	小麦：4AS、4BL、4DL
磷酸核酮糖激酶基因	小麦：6L
磷酸甘油醛脱氢酶基因	小麦：2AL、2BL、7AL；染色体 1、3
磷酸甘油酸激酶基因	小麦：1AL、1BL、1DL、6AS、6BS
磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因	小麦：7AL、7BL
磷酸丙酮酸二激酶基因	小麦：1AL、1BL、1DL
多酚氧化酶基因	番茄：染色体 8

续表

基　因　名　称	染 色 体 定 位
Ⅲ. 贮存蛋白基因	
小麦醇溶蛋白基因	小麦：1A、1B、1D、6A、6B、6D
小麦麦谷蛋白基因	小麦：1BL、1DL、4DL、染色体 6
大麦醇溶蛋白基因	大麦：染色体 6
	大麦：染色体 1、6
玉米醇溶蛋白基因	玉米：染色体 4、7、10；小麦：6A、6B、6D、7A、7B、7D
豌豆球蛋白基因	豌豆：染色体 1、7
凝集素基因	小麦：1A、1B、1D
Ⅳ. 糖代谢基因	
α-淀粉酶基因	小麦：4Aβ、4DL、5AL、4BL、4DS、3AL、3DL、2AS、2BS、2DS
β-淀粉酶基因	小麦：7AS、7BS、7DS、7BL；玉米：染色体 9
蔗糖合成酶基因	小麦：1AL、1BL、1DL、4BS、4DS、4AL
乙醇脱氢酶基因	小麦：1AL、1BL、1DL、4BS、4DS、4AL

材料、试剂和仪器

1. 材料

新鲜植物幼叶、茎端或根尖

2. 试剂

（1）分离缓冲液

Tris · HCl	10mmol/L（pH7.6）
$MgCl_2$	5 mmol/L
巯基乙醇	50mmol/L
蔗糖	1 mmol/L

（2）保存缓冲液

Tris · HCl	50mmol/L（pH8.0）
$MgCl_2$	5 mmol/L
EDTA	0.1mmol/L
甘油	50%
二硫苏糖醇	0.5mmol/L

（3）乙醚

（4）Triton X－100

（5）醋酸洋红（2%）

（6）抽提缓冲液

Tris · HCl	100mmol/L（pH8.0）
EDTA	50 mmol/L
NaCl	500mmol/L
巯基乙醇	10 mmol/L

（7）裂解液 SDS　　20%

(8) 高盐溶液 KAc 5 mol/L

(9) TE

Tris · HCl 50mmol/L

EDTA 10mmol/L

(10) RNase A 溶液

Tris · HCl 10mmol/L (pH7.5)

RNase A 10mg/mL

(11) NaAc 3 mol/L (pH5.2)

(12) 酚/氯仿/异戊醇 (25/24/1)

(13) 异丙醇

(14) 无水乙醇；70%乙醇

(15) 2×CTAB 溶液

CTAB (W/V) 2%

Tris · HCl 100mmol/L (pH8.0)

EDTA 20mmol/L (pH8.0)

NaCl 1.4mol/L

PVP 1%

(16) 10%CTAB 溶液

CTAB 10%

NaCl 0.7mol/L

(17) 沉淀缓冲液

CTAB 1%

Tris · HCl 50mmol/L (pH8.0)

EDTA 10mmol/L (pH8.0)

(18) 高盐 TE 缓冲液

Tris · HCl 10mmol/L (pH8.0)

EDTA 1 mmol/L (pH8.0)

NaCl 1 mmol/L

(19) 氯仿/异戊醇 (24 : 1)

3. 仪器

组织捣碎机，玻璃匀浆机，冷冻离心机，不锈钢网或尼龙网 (100 目，400 目)，显微镜，血球计数板，恒温水浴，高速离心机

实验程序

1. 植物细胞核的分离

为了分离植物核 DNA，首先要分离出植物细胞核。在分离过程中主要存在以下困难：细胞壁的障碍、大量的叶绿体或淀粉粒以及核酸酶等水解酶的存在。目前广泛采用的方法为匀浆法即细胞经匀浆后，再用分级离心或超声波处理等方法进行分离纯化。

(1) 取洗净的植物材料 10 克，放入预冷的烧杯内，加入 100mL 冷乙醚 (以浸没材料为宜)，处理 30s 后倾出乙醚，迅速用冷分离缓冲液洗涤 3 次。

（2）将材料放入组织捣碎机，加入 100mL 分离缓冲液，低速匀浆 30s，高速匀浆 1min。

（3）匀浆液经两层纱布、100 目和 400 目尼龙网过滤，以除去组织碎片和细胞。

（4）滤液在冷冻离心机中以 4 000rpm 离心 5min，弃上清，将沉淀悬浮在分离液内（含有 1%Triton X－100），并用匀浆器研磨，然后在 4 000rpm 离心 5min，收集核沉淀。

（5）将沉淀悬浮于 5mL 的分离液中，轻轻加到含有 0.5mol/L 蔗糖的分离液（8mL）的上层，于 8 000～10 000rpm 离心 7min。核下沉，叶绿体留在上层溶液中。

（6）重复以上步骤数次可以得到较纯净的细胞核。可溶于保存液中于冰箱贮存。

（7）取样用醋酸洋红染色，在显微镜下观察细胞核形态和纯度。

2. 植物细胞核 DNA 的提取

1）酚法提取细胞核 DNA

（1）取 1 克细胞核悬浮液置于 1.5mL 离心管中，加入 500μl SDS 溶液，剧烈振荡混匀，将离心管置于 65℃水浴保温至少 10min。

（2）向其中加入 150μl KAc，再次剧烈振荡混匀，冰上保温 20min。

（3）4℃条件下 20 000g 离心 20min，将上清转至另一 1.5mL 离心管。

（4）加入 1 倍体积的异丙醇，混匀后置－20℃30min，15 000g 离心 10min，用 TE 溶解沉淀后，移至另一离心管中，8 000g 离心 10 min，上清再移至一新离心管。

（5）向管中加入 5μl RNase A 溶液，置 37℃保温 5min。

（6）用苯酚/氯仿/异戊醇抽提，上清转至一新管中。

（7）向管中加入 1/10 体积的 NaAc 和 2 倍体积的 100%乙醇，轻轻混匀后－20℃或室温下放置 30min。

（8）在 4℃下，20 000g 离心 10min，沉淀经 70%乙醇清洗后吹干，溶于 50～100μlTE 中。

2）CTAB 法提取细胞核 DNA

CTAB 是一种去污剂，它能与核酸形成复合物，在高盐溶液中可溶并且稳定存在。若降低盐浓度，CTAB 与核酸的复合物会因溶解度降低而沉淀出来，而大部分蛋白和多糖仍溶于溶液中。

（1）取 1g 细胞核悬浮液置于 1.5mL 离心管中，加入 65℃预热的 2×CTAB 600μl，迅速混匀。

（2）将离心管置 65℃水浴中保温 10min。

（3）加等体积的氯仿/异戊醇，轻轻地颠倒混匀，室温下 12 000rpm 离心 10 min，移上清至另一新管中。

（4）加入 1/10 体积的 10%CTAB 溶液，混匀后重复步骤（3）一次。

（5）加入等体积的沉淀缓冲液，混匀，65℃水浴 5min 或室温放置 1hr。8 000rpm 离心 10min，弃去上清，加 300μl 高盐 TE 缓冲液溶解 DNA 沉淀。

（6）向离心管中加入 2 倍体积的 100%乙醇，－20℃放置 1hr 或－80℃放置 10min，12 000rpm离心 10～15min。

（7）用 70%乙醇清洗沉淀 2 次，吹干后溶于 100μlTE 中。

（8）向管中加入 5μlRNase A 溶液，置 37℃15min。用氯仿/异戊醇抽提，上清转置一新离心管中，重复步骤（6）步一次。

（9）沉淀经 70%乙醇清洗后吹干，溶于 50～100μl TE 中。

结果分析

1. 细胞核形状观察及浓度计算

在光学显微镜下，染色的细胞核为红色的圆形或椭圆形。用血球计数板计算核的浓度，根据需要将核制备物用保存液稀释至一定浓度。

2. 核 DNA 含量和质量的测定

用紫外分光光度计在 230nm、260nm 和 280nm 波长分别读数。其中 260nm 读数用来估计样品中 DNA 的浓度，1 个 OD 值相当于 50μg/mL 双链 DNA。OD_{260}/OD_{280}与 OD_{260}/OD_{230}的值用于估计 DNA 的纯度。对于 DNA 纯制品，其 OD_{260}/OD_{280}应大于 1.8，OD_{260}/OD_{230}应大于 2。用琼脂糖凝胶电泳（0.8%）检测核 DNA 的质量（见图 1.2），并用梯度 Marker 估计浓度。

样品含量 μg/mL＝OD_{260}×稀释倍数×50μg/mL.

3. DNA 沉淀呈棕色，难以酶切

植物材料含有大量酚类化合物，与 DNA 共价结合，使 DNA 呈棕色，并抑制 DNA 的酶解反应。为防止此情况出现，可在加入 2×CTAB 的同时加入 2%～5%的巯基乙醇，或者加入亚精胺（100μl DNA 加 5μl 0.1mol/L 的亚精胺）。

4. DNA 中含有多糖或盐类

将 DNA 用 100%乙醇或异丙醇沉淀出来，离心，沉淀用 70%乙醇清洗两次或更多次，吹干后重溶于 TE 中。（注意乙醇一定要吹干，否则电泳点样时，样品上漂）

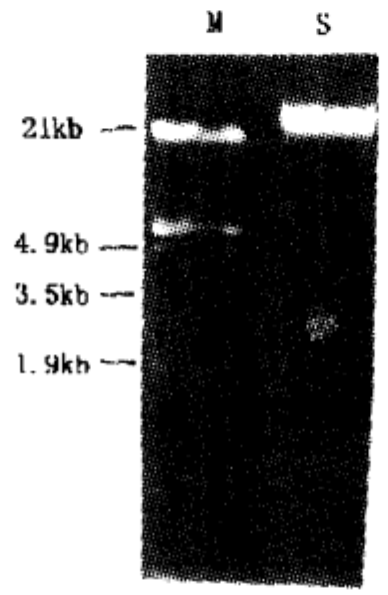


图 1.2 玉米根细胞 DNA 电泳图谱
M：Marker λDNA/EcoR Ⅰ＋Hind Ⅲ
S：玉米根基因组 DNA（标准的应是一条电泳带，若降解则成为弥散状）

5. DNA 已降解电泳条带呈弥散状

样品降解可能有两种情况：一是机械振动过于剧烈，二是操作过程中 DNase 污染。在提取 DNA 的各个操作过程中要避免剧烈振荡，提取液及用品要高温高压灭菌。另外，使用 Tip 头吸取过程中应避免产生气泡，Tip 头应剪去 Tip 头尖，避免反复冻融 DNA。

思考题

1. 应用 100%乙醇或异丙醇沉淀 DNA 各有什么优缺点？DNA 水溶液和有机溶液的体积各为多少？

2. 如何减少 DNA 的降解？

参考文献

1. 张自立，俞新大等，1990，植物细胞和体细胞遗传学技术与原理，科学出版社
2. 顾红雅等，1995，植物基因与分子操作，北京大学出版社
3. 赵微平著，1993，植物基因组：构建、表达和调控，首都师范大学出版社
4. 章静波主编，1995，细胞生物学实用方法与技术，北京医科大学中国协和医科大学联合出版社

（颜 芳）

1.3.2　植物线粒体基因组 DNA 的提取

线粒体是真核细胞内一种重要的细胞器。线粒体基因组是一种细胞核外的基因组。线粒体基因组是一个相对独立的复制单位，有 DNA 复制、转录、转译的自主性，但又受到核遗传系统的部分控制。目前在动植物中发现的线粒体 DNA 完全不同于核 DNA，有两个显著特点：一是不同种的线粒体基因组大小差异很大；二是不同种线粒体基因组的存在形式也很不同。大多数动物的 mtDNA 只有约 5μm 长，15 000 个核苷酸，分子量为 10^2 道尔顿，而酵母 mtDNA 的长度是动物的 5 倍，植物 mtDNA 的长度又为酵母的 5 倍，大小变动在 200kb（油菜）和 2 500kb（西瓜）之间，基因组的信息量比动物的要大 30～100 倍，并且常常是由多个 mtDNA 环组成，差别选择大的原因可能就在于存在着非编码的 DNA 所致。

动物细胞 mtDNA 的构型比较简单，是一种周长为 5.0～5.8μm 的环状分子。最近对人的细胞株线粒体 DNA 的研究表明，有 1%左右的 DNA 是线形，50%是环状，其余是一种连环多重体，植物细胞的 mtDNA 的构型则比较复杂，有开环、共价闭环、超螺旋、直线型等形式。环状 DNA 分子是由主环和含有直接或倒置重复的小环组成的。此外，在 mtDNA 中也存在有叶绿体 DNA。所有组成 mtDNA 的 DNA 分子均是借助于在专门位置上的重组，来自一个个大的环状分子，因为在这个环状 DNA 分子上包含所有遗传信息，称为“主宰染色体”。除了这个高分子量的主基因组外，某些植物的线粒体还含有较小的 DNA 分子。

已研究的植物线粒体的基因组有 20 余种。（见表 1－3）

表 1－3　植物线粒体基因组已鉴定的基因

翻　译　装　置		基　　因
核糖体 DNA		rrn15，rrn18，rrn16
核糖体蛋白	小亚基	rps1，rps3，rps7，rps12，rps13，rps14，rps19
	大亚基	rpl2，rpl5，rpl16
tDNA		至少 16 个基因
呼吸链亚基复合物	NADH—脱氢酶	nad1，nad2，nad3，nad4，nad4l，nad5，nad6，nad7，nad9
	细胞色素 b	Cob
	细胞色素 c 氧化酶	cox Ⅰ，cox Ⅱ，cox Ⅳ
	ATP 合成酶	atp1，atp6，atp9

线粒体 DNA 是较易得到的具有完整功能的细胞器 DNA，所以它是研究真核细胞基因组结构及其表达的良好模型。制备 mtDNA 是研究线粒体基因组结构与功能的必要前提。为了获得较纯的 mtDNA，首先要从完整的细胞内分离出线粒体，保持形态上的完整性，不污染细胞核 DNA，且为能有较高的产率，通常在等渗情况下温和破碎细胞，以得到完整细胞器，再用 DNase 处理，除去细胞器表面沾污的细胞核 DNA，然后再从线粒体中分离 DNA。

材料、试剂和仪器

1. 材料

植物悬浮培养细胞或新鲜叶片

2. 试剂

（1）缓冲液 SGB：0.3mol/L 甘露醇，50mmol/L Tris·HCl pH8.0，3mmol/L EDTA，0.1%BSA，20mmol/L 巯基乙醇

（2）10mmol/L $MgCl_2$

（3）DNase I

（4）梯度介质液 GM：0.3mol/L 蔗糖，50mmol/L Tris·HCl pH8.0，20mmol/L EDTA，0.1%BSA

（5）蔗糖梯度液 A：10mL 1.6mol/L，10mL 1.2mol/L，10mL 0.6mol/L 蔗糖溶于 50mmol/L Tris·HCl pH8.0，20mmol/L EDTA，0.1%BSA

（6）缓冲液 HTE：50mmol/L Tris·HCl pH8.0，20mmol/L EDTA

（7）Sarkosyl 溶液：50mmol/L Tris·HCl pH7.2，20mmol/L EDTA，20% Sarkosyl

（8）缓冲液 LGB：0.3mol/L 甘露醇，50mmol/L Tris·HCl pH8.0，3mmol/L EDTA，0.1%BSA，9mmol/L 巯基乙醇，1.0%PVP

（9）蔗糖梯度液 B：4mL 2.0mol/L，10mL 1.6mol/L，10mL 1.2mol/L，8mL 0.6mol/L 蔗糖溶于 50mmol/L Tris·HCl（pH8.0），10mmol/L EDTA

（10）饱和酚：氯仿（1∶1），氯仿：异戊醇（24∶1）

（11）水饱和乙醚

（12）3mol/L NaAc

（13）无水乙醇

（14）70%乙醇

注：巯基乙醇和 BSA 在其它溶液组分灭菌后再加入。

3. 仪器

匀浆器，高速离心机，超速离心机，注射器，纱布

操作程序

1. 悬浮培养细胞 mtDNA 的提取

（1）采用 3 000rpm 离心 5～10min（4℃），收集 300～600g 悬浮培养细胞。

（2）将收集到的细胞重悬于冰冷的研磨缓冲液 SGB，按 1∶1 比例重悬。此后的步骤全部在 2℃～4 ℃进行。

（3）将细胞重悬液倒入匀浆器中 1min，过滤之后再离心（3 000rpm，10min），去除细胞碎片、质体和细胞核。

（4）上清夜再离心（9 500rpm，15min）。将线粒体沉淀物悬于约 25mLSGB，加入 $MgCl_2$ 溶液。

（5）用 100μg/mL DNaseI 处理线粒体悬液。反应完后加入 20mmol/L EDTA，以终止反应。

（6）用 40mLGM 冲洗线粒体，然后离心（15 000g，15min）。再用 8～12mLGM 重悬线粒体沉淀物。

（7）在蔗糖梯度液 A 上铺上 3～4mL 线粒体悬浮液。

（8）离心（15 000g）收集线粒体，再重悬于 7mL HTE 中。

（9）加入 Sarkosyl 溶液以裂解线粒体。加入 1mg/mL 蛋白酶 K，于 37℃下保温 1～2hr 或室温过夜，使蛋白质消化。

（10）用等体积的饱和酚：氯仿（1∶1）和氯仿：异戊醇（24∶1）各抽提一次。

（11）取上清液，加入等体积的水饱和乙醚，反应 5min，于 7 000g 离心 5min，重复 2 次。吸去上层乙醚，并将下层液体于 65℃下蒸发 10min 以除去乙醚。

（12）加入 2 倍体积无水乙醇和 1/10 倍体积的 3mol/L NaAc，置于－20℃ 1hr 以上或过夜以沉淀 mtDNA。

（13）于 8 000g 离心 10min，用 70%乙醇洗沉淀，吹干后溶于 TE 或无菌水。

2. 从绿叶中提取 mtDNA

（1）称取 100～200g 新鲜叶片，放入冷的匀浆器中，加入 5 倍体积的叶片研磨缓冲液 LGB，高速匀浆 1min。然后将匀浆液用 4 层灭菌纱布过滤，置于一灭过菌的烧杯中。

（2）将过滤后的匀浆液移至离心管中，3 500rpm 离心 10min。取上清于 7 800rpm 离心 30min。

（3）用 25mL LGB 重悬上述沉淀物，加入 $MgCl_2$ 溶液。加入 100μg/mL DNaseI，于冰上反应 30min，最后用 20mmol/L EDTA 终止反应，并用 30mLGM 稀释之。

（4）于 11 500rpm 离心 15min，收集线粒体，将线粒体悬于 6～8mLGM 溶液中，取 3～4mL 铺入蔗糖梯度液 B 中，25 000rpm 离心 1hr 之后，收集最低层的界面条带。

（5）用约 20mLGM 冲洗线粒体后，于 15 000g 离心收集线粒体。

（6）以下步骤同 1 中的第（9）～（13）步。

实验结果分析

1. 计算

用紫外分光光度计测定 OD_{260}和 OD_{280}，计算提取的 mtDNA 的产量和纯度。

2. 电泳检测

mtDNA 的琼脂糖凝胶电泳往往呈现四条带，按照迁移率由大到小分别为超螺旋型分子、带有 D 环的分子、直线型分子和开环型分子。

注：

（1）提取 mtDNA，要尽可能选用不含叶绿体的组织材料。

（2）悬浮培养细胞应在暗处进行并培养至白色或浅黄色，这样的细胞通常只有少量的酚物质，因而只需用巯基乙醇。如果酚类物质的存在影响到 mtDNA 的产量，则可用 1%PVP。

（3）Hanson 等人（1986）认为，取材用悬浮培养的植物细胞比直接用植物组织好，因为有的植物器官（如禾本科植物的叶）由于纤维太多不易被彻底磨碎，细胞破裂不彻底，从而影响线粒体 DNA 的提取量。因此在植物器官做提取材料时，往往要在研磨后再用纱布过滤。

（4）用 DNaseI 处理线粒体粗提物的目的在于去除核 DNA 的污染，提高线粒体 DNA 的纯度；但如果采用 DNase I 处理会使线粒体 DNA 的产量大大下降，这个步骤可考虑省去。

思考题

1. 要获得 mtDNA，首先要制备线粒体，试述制备线粒体的原理。
2. 获得的 mtDNA 可用于哪些方面的研究？

参考文献

1. 北京大学生物学遗传学教研室编，1984，遗传学实验方法和技术，高等教育出版社
2. 孙崇荣，李育庆（译），1987，植物基因工程技术，上海科学技术文献出版社
3. 李静涵，1988，线粒体，北京大学出版社
4. 郑国昌，1992，细胞生物学（第二版），高等教育出版社
5. 傅荣绍，孙勇如，贾士荣，1994，植物遗传转化技术手册，中国科学技术出版社
6. 顾红雅等，1995，植物基因与分子操作，北京大学出版社
7. 章静波，1996，细胞生物学实用方法与技术，北京医科大学中国协和医科大学联合出版社
8. 刘良式等，1997，植物分子遗传学，科学出版社

（杨　静）

1.3.3 植物叶绿体基因组 DNA 的提取

叶绿体是植物进行光合作用极为重要的细胞器，它具有独立复制的遗传物质。本世纪初，人们根据植物叶片的花斑现象具有母系遗传的特征，推测在叶绿体上可能存在着染色体外的遗传因子。直到 60 年代初，随着核酸检测与电镜技术的发展，叶绿体基因组的存在才最后由 Ris 等人证实。大多数高等植物的 ctDNA 长度均为 120～180kb 的范围内。叶绿体基因组是环状双螺旋 DNA 分子，它除了编码 rRNA 和 tRNA 以外，还可以编码一些蛋白，这些蛋白大多与叶绿体本身的发育及光合作用有关。叶绿体具有极其复杂的结构和功能，而且它具有完整的叶绿体基因表达的生化装置，包括 DNA 多聚酶、RNA 多聚酶、核糖体、rRNA 和 tRNA 合成酶等。研究叶绿体基因离不开叶绿体 DNA 的分离和纯化技术，本实验介绍叶绿体 DNA 的常用分离纯化方法。此外，将叶绿体 DNA 编码的基因列入表 1－4 中：

表 1－4　植物叶绿体基因组已鉴定的基因

基　　因	基因编码的蛋白
Ⅰ. 叶绿体基因表达所需基因	
1. 转录过程所需基因	
RNA 聚合酶　rpoA	38KDa α 亚基
RpoB	120KDa β 亚基
rpoC1	78KDa β′ 亚基
rpoC2	180KDa β″亚基
2. 翻译过程所需基因	
核蛋白体 RNA 基因（rrm）	16S，23S，4.5S，5S rRNA
核蛋白体基因rps（12 个）	核蛋白体小亚基多肽
rpl（8 个）	核蛋白体大亚基多肽
转移 RNA 基因 trn（32 个）	各种 tRNA
起始因子 infA	起始因子 A
延伸因子 tufA	延伸因子
3. 复制过程所需基因	
DNA 聚合酶 ssb	DNA 单链结合蛋白

续表

基因		基因编码的蛋白
Ⅰ. 与光和作用有关的基因		
1. Rubisco	rbcL	Rubisco 大亚基
2. 光系统 I	psaA	PSI 作用中心 A1 蛋白
	psaB	PSII 作用中心 A2 蛋白
	psaC	9KDa 多肽
3. 光系统 Ⅱ	psbA	32KDa 作用中心蛋白 D1
	psbB	47KDaChla 结合蛋白
	psbC	44KDaChla 结合蛋白
	psbD	作用中心蛋白 D2
	psbE	细胞色素 b559 的 9KDa 多肽
	psbF	细胞色素 b559 的 4KDa 多肽
	psbG	24KDa 多肽
	psbH	10KDa 磷蛋白
	psbI	4.5KDa 作用中心多肽
	psbK	5.9KDa 多肽
	psbL	6.8KDa 多肽
4. 细胞色素 b6/f 复合物	petA	细胞色素 f
	petB	细胞色素 b553
	petD	15KDa 亚基Ⅳ
	petE	4KDa 亚基Ⅴ
5. H^+－ATP 合成酶	atpA	CF1 的 亚基
	atpB	CF1 的 亚基
	atpE	CF1 的 亚基
	atpF	CF0 的亚基 I （18KDa）
	atpH	CF0 的亚基 Ⅱ （19KDa）
	atpI	70KDa 疏水蛋白
Ⅱ. NADH 脱氢酶基因	ndh－A－K	NADH 脱氢酶各亚基

材料、试剂和仪器

1. 材料

菠菜、豌豆、莴苣、玉米等叶片

2. 试剂

（1）STM/BSA 溶液：0.35mol/L 蔗糖，50mmol/LTris·HCl，5mmol/L $MgCl_2$，5mmol/L 巯基乙醇，0.1%BSA，pH 7.5

（2）缓冲液 A：0.3mol/L 甘露醇，50mmol/LTris·HCl，5mmol/L $MgCl_2$，5mmol/L 巯基乙醇，0.1%BSA，pH 7.5

（3）缓冲液 B：0.3mol/L 甘露醇，50mmol/L Tris·HCl，20 mmol/L EDTA pH 8.0

（4）TE 缓冲液：50mmol/L Tris·HCl，20mmol/L EDTA pH 8.0

（5）10%SDS

（6）蛋白酶

（7）DNase I

（8）RNase 溶液：1mg/mL（用 10mmol/L Tris·HCl pH 7.5，0.015mol/L NaCl 溶液配制，并预先用 85 C保温 10min，以灭活可能混入的 RNase）

（9）苯酚溶液（用 0.1mol/L Tris·HCl，pH8 溶液饱和）

（10）氯仿/异戊醇（24∶1）

（11）95%乙醇

3. 仪器

微量台式离心机，组织捣碎器，水浴锅

实验程序

植物细胞 DNA 大部分存在于细胞核中，在分离提纯叶绿体 DNA 时容易受到核 DNA 的污染，故欲制取比较纯净的 DNA，必须首先分离叶绿体，采用以下两种方法可以制备纯净的叶绿体，然后再从叶绿体中提取 DNA。

1. 叶绿体的分离与纯化

1）蔗糖密度梯度离心法分离纯化叶绿体

（1）幼嫩菠菜等植物的叶片 200g，洗净。叶片较大的除去叶脉，将叶片剪碎。

（2）将剪碎的叶片放入组织捣碎器中，加入预冷的 STM/BSA 溶液 500mL，组织匀浆后，将匀浆液用 4 层灭菌的纱布过滤，滤液收集于离心管中。

（3）滤液经 400rpm 离心 5min，除去细胞碎片和未破碎的完整细胞。

（4）将上层悬浮液转入另一离心管，再次于 2 000rpm 离心 10min，收集沉淀，并用适量 STM 溶液洗涤离心（同上）两次。最后悬浮于 20mL 冷 STM 溶液中，此为粗制叶绿体悬液，再用蔗糖梯度离心纯化。

（5）蔗糖梯度制备：在 50mL 离心管中，依次加入 55%、40%、20%的蔗糖溶液 15mL、10mL、15mL，放置 1～2hr 后使用。

（6）在蔗糖梯度的液面上缓慢地铺加 5mL 粗制叶绿体悬液，于 4 000rpm 离心 20min，收集含有叶绿体的区带，并用适量 STM 溶液离心洗涤两次（3 500rpm，离心 10min），所得沉淀为纯净的叶绿体制剂。将其悬浮于 10mL TE 缓冲液中备用。上述各步操作均应在 4 C下进行。

2）差速离心法分离与纯化叶绿体

（1）新鲜幼嫩叶片 200g，洗净，去叶脉，放入组织匀浆器中，加入 800mL 预冷的缓冲液 A，慢速及快速捣碎各 30min，经 5 层纱布过滤后，滤液收集于离心管中。

（2）400rpm 离心 5min，取悬浮液再次离心两次，除去完整细胞碎片。

（3）将上层悬液转入另一离心管中，2 000rpm 离心 10min，收集叶绿体沉淀。

（4）将沉淀悬浮于 20mL 缓冲液 B，于 2 000rpm 离心 10min，沉淀再用缓冲液 B 洗涤两次，重新悬浮于 10mL TE 中，于 4 C保存备用。

2. 叶绿体 DNA 的提取

（1）用 100μg/mL DNase I 处理叶绿体悬液，37 C 1hr，除去核 DNA 的污染。酚/氯仿抽提一次。

2. 方法

(1) 温和处理 于65℃用几百毫升的温和洗脱液洗膜2hr。

(2) 中强度处理 于45℃，在0.4mol/L NaOH中洗膜30min。然后用几百毫升中强度洗脱液于室温下漂洗2次，每次10min。

(3) 高强度处理 将煮沸的几百毫升0.1%SDS倒在膜上。冷却至室温。

(4) 将膜放在干的Whatman 3滤纸上，用另一张滤纸吸干多余的液体，用塑料膜包好进行放射自显影或用盖革计数器探测。若放射性较强，还应在高强度下洗。

(5) 这时膜可以用于再杂交或干燥后室温保存备用。

参考文献

1. DIG DNA Labeing and Detection Kit（德国 Boehringer Mannheim 公司产品）操作说明书

2. 卢圣栋，1993，现代分子生物学实验技术，189～193

3. F. 奥斯伯，R.E. 金斯顿，J.G. 塞得曼等著，1998，精编分子生物学实验指南，55～67

（祁晓廷）

2.5 菌落或噬菌斑的原位杂交

材料、试剂和仪器

1. 材料

噬菌体文库，筛选探针

2. 试剂

(1) NC膜处理液

变性液　1.5mmol/L NaCl、0.5mmol/L NaOH

中和液　1.5mmol/L NaCl、0.5mmol/L Tris·HCl 调pH至8.0

漂洗液　2×SSC

(2) 噬菌体贮存液

SM Buffer（100mL）：0.58g NaCl、0.2g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$、25mL 2mol/L Tris·HCl (pH7.5)、0.01g gelatin

(3) 10mmol/L $MgSO_4$：0.12323g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 定容至50mL 分装后高压灭菌。

(4) 放射性探针杂交筛选所用溶液

杂交液：6×SSC、5×Denhardt、0.5%SDS、ddH_2O

洗膜液：(1) 2×SSC 及 0.1%SDS (2) 0.1×SSC 及 0.1%SDS

3. 仪器

恒温培养箱，摇床，杂交袋，杂交盒，放射自显影设备

实验程序

1. 铺板

(1) 在LB－Tet（12.5μg/mL）划线培养宿主菌XL1－blue。在50mL LB broth中接种一单菌落，37℃，200rpm摇培4～6hr，使 $OD_{600}<1.00$。

（2）1 000rpm 离心 10min 收集菌体，弃上清，用 10mmol/L $MgSO_4$ 重悬细菌至 $OD_{600}=0.5$。

（3）从文库中取出 2 000pfu 噬菌体粒子加到已重悬好的 200μl 宿主菌中，混匀，37℃吸附 15min。

（4）加 3mL 顶层琼脂（48℃）迅速混匀，倒在提前预热至 37℃的底层琼脂上，摇均匀。凝固后 37℃倒置培养 6～8hr，待噬菌斑直径为 1～1.5mm 时，取出置 4℃存放。

2. 转 NC 膜

（1）将铺好的平板置 4℃至少 2hr，使顶层琼脂硬化（以下操作需戴一次性塑料手套）。

（2）将处理好的 NC 膜（用 ddH_2O 浸润后，滤纸包好高压灭菌）编号后细心放到顶层琼脂表面，先中间后周围，避免产生气泡，吸附 1min。在不对称位置上打孔作标记，细心将膜剥下以防揭下顶层琼脂。再转下一张膜，吸附时间为 2min。

然后将膜做如下处理：变性液浸 4min；中和液浸 5min；漂洗液浸 30s。处理时有粘噬菌体的一面向上。

（3）放在干滤纸上晾干，然后 80℃烘干 1.5～2hr。

3. 噬菌斑原位杂交

（1）膜处理：膜经烘干后，在 2×SSC 中浸没 5min。

（2）预杂交：加热无鲑鱼精 DNA 预杂交液至 50℃左右，100℃变性鲑鱼精 DNA10min，冰上 5min，然后加到温育至 50℃预杂交液中（500μg/mL）。快速浸没每一张膜，倒入更多的预杂交液。65℃预杂交 4～6hr。

（3）探针的制备：预杂交期间可以制备探针。用缺口平移法（Nick Translation）制探针。方法参见 Nick Translation System 说明，标记用（$\alpha-^{32}P$）dCTP。

（4）杂交：将标记好的探针沸水浴变性 10min，冰上 5min。将预杂交好的膜浸在 10mL 杂交液中，加入变性的探针。68℃杂交 18hr。

（5）洗膜及放射自显影：室温下用洗膜液Ⅰ（2×SSC，0.1%SDS）200mL 振荡洗膜 5min。重换一次洗膜液Ⅰ洗 15min。55℃用洗膜液Ⅱ（1×SSC，0.1%SDS）200mL 振荡洗膜 30min，68℃下用洗膜液Ⅱ100mL 再洗 30min。洗膜时随时用探测器检查，以防洗得过度。将洗好的膜放在干滤纸上空气中晾干，用保鲜膜包好，暗室中压 X 光片，将放射性杂交残液加墨水滴在滤纸上做定位标志。－70℃放射自显影 3～5 天。经显影、定影获得杂交结果。

（6）将 X－光片、NC 膜与原板对照挑出阳性斑，再铺板进行第二次杂交，方法同上。

结果与分析

在 X－光片上出现黑色杂交斑点，但有的是污染所致，需与真正的阳性杂交信号区分，真正的杂交信号往往边缘有些模糊，而污染则呈现清晰。当然只是经验上的判断。

思考题

1. 哪些因素影响噬菌斑杂交的特异性？
2. 应如何提高杂交的专一性？

参考文献

1. 李永明，赵玉琪等著，1998，实用分子生物学方法手册，57～72
2. F. 奥斯伯，R. E. 金斯顿，J. G. 塞得曼等著，1998，精编分子生物学实验指南，154～160

（祁晓廷）

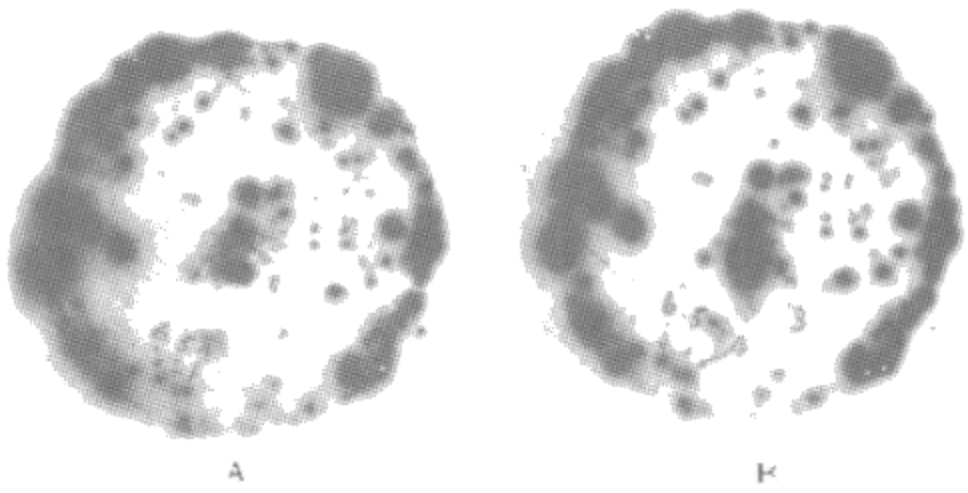


图 2.9 噬菌斑原位杂交放射自显影图（差示筛选）

A：完全培养液（+Fe）的玉米根的 cDNA 为探针

B：缺铁培养液的玉米根 cDNA 为探针

从箭头处可以看出缺铁处理的 6 个 cDNA 克隆（B）有明显的增加

2.6 DNA 序列分析

——Sanger 双脱氧终止－Blue 体系 DNA 序列分析

DNA 序列分析方法是直接用闭合环形的双链重组子（Pblue+DNA 片段）按双脱氧终止法作 DNA 序列分析，所以也称为利用双链质粒 DNA 模板的双脱氧 DNA 序列分析法（dideoxy sequencing using double－stranded Plasmid DNA templates）。

Sanger 双脱氧终止法的基本原理：双脱氧核苷三磷酸对 DNA 聚合酶的抑制效应是当 2′3′－双脱氧核苷三磷酸(ddNTP)掺入到核苷酸生长末端，取代了脱氧核苷(dNTP)之后，由于 ddNTP 没有 3′－OH 基团，所以核苷酸链就不再能够继续延长(终止了链的合成)，于是在本该由 dNTP 掺入的位置上，便发生特异性的终止效应。例如在同一个反应试管中，加入同一种 DNA 合成的引物和模板，DNA 聚合酶，ddTTP，dTTP，以及其它 3 种脱氧核苷三磷酸(dATP dGTP dCTP)，其中 dATP 是带^{32}P 放射性标记的，那么经过适当的温育之后，将会产生出不同长度的 DNA 片段混合物。它们全都具有同样的 5′－末端，并在 3′末端的 ddTTP 处终止。将这种混合物，加到变性的聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳分离，就可以获得一系列全都以 3′－末端 ddTTP 为终止残基的 DNA 片段的电泳谱带模式。使用其它核苷酸的抑制物，如 ddATP，ddCTP，ddGTP，并分别在不同反应试管中温育，然后连同第一个 ddTTP 反应，平行加到同一变性凝胶上作电泳分离，最后再通过放射自显影技术，检测单链 DNA 片段的放射性条带。结果可以从放射性 X 光片上，直接读出 DNA 的核苷酸顺序，见图 2.10

材料、试剂和仪器

1. 试剂

（1）测序套药（kit）

（2）α－^{32}PdATP

（3）溶菌酶

在植物基因操作中，行进转录分析已成功地用于对光调控基因、激素调控基因、组织及器官特异性基因、生物钟调控基因等的转录调控研究，所用的探针涉及质粒、纯化的 DNA 片段和反义单链 RNA 等。值得注意的是，这种转录分析方法只能检测探针杂交上的基因区域的转录情况，因此，它为研究基因转录调控中 RNA 链的延伸过程提供了一个好的方法。除此之外，行进转录分析还能用于研究基因的瞬时表达。

材料、试剂和仪器

1. 试剂

（1）转录缓冲液（2×）：

50mmol/L	Tris·HCl（pH7.8）
150mmol/L	NH_4Cl
15mmol/L	$MgCl_2$
1mmol/L	ATP
1mmol/L	CTP
1mmol/L	GTP

（2）裂解缓冲液：

100mmol/L	NaAc（pH5.2）
10mmol/L	EDTA
2%	arkosyl（W/V）

（3）杂交缓冲液：

6×SSC

1% SDS

10% 去离子甲酰胺

（4）清洗缓冲液：

2×SSC

0.1% SDS

（5）20%三氯乙酸（TCA）

（6）5mol/L NaCl

（7）水饱和酚

（8）氯仿

（9）RNasin（RNase 抑制剂）

（10）[α-^{32}P] UTP

2. 仪器

（1）冷冻离心机及离心管

（2）狭线印迹用的代滤板的多样过滤加样器

（如：Schleicher and Schuell 公司的 Minifold 2）

（3）真空泵

（4）滤膜

（5）盖格计数器

（6）封口机

（7）恒温水浴

实验程序

1）细胞核的提取见 1.3.1

2）mRNA 探针的准备

（1）向一灭菌干净的 Eppendorf 管中加入 100μl 2×转录缓冲液、5 单位（units）RNasin 和 100μCi 的 α－^{32}P－UTP，混匀后，向体系中加入 100 μl 的分离好的细胞核（约 10^7 个），盖紧后，置于 30 C 恒温水浴中保温 30min，每 5min 倒置混匀一次。

（2）向反应体系中加入 400 μl 裂解缓冲液，混匀；再加入 400 μl 水饱和苯酚，盖紧，置 70 C 保温 15min。

（3）将管放置冰上 10min，向体系中加入 50μl 5mol/L NaCl 和 200μl 氯仿，彻底混匀后，4 C 条件下 12 000rpm 离心 15min。

（4）上清转至另一新管，加入等体积的 20% TCA，混匀后，置冰上保温 15min。

（5）真空抽滤，将沉淀 RNA 吸附于硝酸纤维素滤膜上，然后分别用 10% TCA 洗膜 2 次，80%乙醇洗膜 1 次。

（6）将膜转至另一新管中，加入 1mL 杂交缓冲液，置 70 C 洗 RNA 30min；用大枪头将膜挤压至管底，收集所有液体，加入 tRNA 至 50μg/mL。

3）多样过滤加样器的准备

（1）用 0.1 mol/L NaOH 和 dH_2O 清洗加样器。

（2）切一张与过滤加样器大小一致的尼龙膜或 NC 膜，浸于 10×SSC（用于尼龙膜）或 20×SSC（用于 NC 膜）10min。

（3）将膜放于加样器中，按使用说明安装带滤板的多样过滤加样器，并在每条狭线都加入 10×SSC，保证装置没有空气泄漏。

4）待测质粒的准备

（1）将含有待检测基因的质粒（如一组功能基因）各 0.5μg 用适当的限制性内切酶切开，置 100 C 5min 终止反应，冰上放置 10min；然后加入 200μl 冰冷的 5×SSC。

（2）按照狭线印迹杂交装置的要求，把变性的 DNA 上样至狭线中，再用 500μl 15×SSC 洗一次，然后真空烘干滤膜。

（3）将该滤膜用杂交缓冲液预杂交至少 2hr，然后加入 2）中标记好的 RNA 探针，封口后，将杂交袋置 90 C 水浴中 2min，然后至 48 C 摇动杂交 36～48hr。

（4）杂交完成后，先在室温下用清洗缓冲液清洗两次，每次 5min，然后在 55 C～65 C 再洗 45min，晾干后，即可压 X 光片。

（5）将 NC 膜等体积剪下，作液闪分析。

结果分析

（1）UTP 掺入只保持极短时间（小于 10min）。这种情况的起因很可能是由于反应体系中有具有 UTP 水解活性的物质存在。解决的办法是向 2×转录缓冲液中加入一定量的未标记的 UTP。

（2）在空载体狭线处杂交信号强。这种情况肯定是假阳性杂交的结果。为去除这种情况，将膜在 37 C 先用 2×SSC 清洗 10min，然后在用 2×SSC，10μg/mL RNase A 清洗 30min，晾干后再压片，应该能避免这种情况。

参考文献

1. 顾红雅等，1995，植物基因与分子操作，北京大学出版社
2. ［美］F. 傲斯泊，R.E. 金斯顿，R. 布伦特等，1998，精编分子生物学实验指南（译）

（印莉萍）

DNA 时错误率最低的（1×10^{-6}），它比 Taq 及其突变体低 10 倍，比 Vent 和 Pwo 低 2～4 倍。

3. 反应缓冲液

主要成分为 10～50mmol/L Tris·HCl，50mmol/L KCl，1.5mmol/L $MgCl_2$，其中 Mg^{2+} 浓度因能影响引物退火的程度、模板及 PCR 产物的解链温度、产物的特异性、引物二聚体的形成，酶的活性及精确性而显得极为重要。

4. 模板

可以是基因组 DNA、质粒 DNA、cDNA、RNA 等。

（孔冬冬　印莉萍）

5.1.1 基础 PCR

材料、试剂和仪器

1. 材料

引物，模板 DNA

2. 试剂

PCR Kit，液体石蜡油

3. 仪器

PCR 仪（PE480），电泳仪，紫外照相装置

操作程序

（1）在一灭菌的 0.5mL 小离心管中依次加入（总体积为 25 μl）：

10×buffer	2.5μl
4×dNTPs	2.0μl
primer I（20pmol/L）	2.0μl
primer II（20pmol/L）	2.0μl
Template（nDNA）	1.0μl
ddH_2O	15μl

混匀，沸水浴 5min，冰上 4min。然后再加入：

Taq E	0.5μl（2U）
矿物油	25μl

（2）把加样品的 Ep 管稍离心后，放入已编好程序的 PCR 仪中。其上机的循环条件为：94℃变性 1min，50℃退火 1min，72℃延伸 1.5min，共进行 30 个循环，然后 72℃再延伸 10min 以补平 DNA 末端，－20℃保存。

（3）1%Agarose gel 电泳检测，紫外照相。

结果与分析

PCR 产物经电泳检测在预计的分子量处出现单一 DNA 条带，但常常是一条带有主带的弥散带，这在以核基因组 DNA 做模板时常会出现，可能的原因是：核基因组复杂度高，退火温度低，延伸时间长，引物和模板量大等。解决的方法有：减少模板和引物量，提高退火温度甚至在 68℃下退火和延伸，降低退火和延伸时间，减少循环次数，改变 Mg^{2+} 浓度（1.5～

8mmol/L）等。

思考题

1. PCR 的特异性表现在哪几方面？

2. PCR 产物是多条带甚至是一条弥散带时应如何解决？

参考文献

1. ［美］C. W. 迪芬巴赫，G. S. 德维克斯勒，1998，PCR 技术实验指南（译），科学出版社 89～103

2. F. M. Ausubel, R Brent , R. E. Kingston, 1995, Short Protocols in Molecular Biology , Third Edition, Wiley &Sons, Inc

附：简并引物和诱变引物的设计

尽管在概念上是简单的，但要成功地得到靶序列的扩增，PCR 要求模板、引物、dNTP 和 DNA 聚合酶之间的无数复杂相互作用。引物设计连同反应成分浓度以及热力循环参数的变化提供了其他分子生物学技术中少见的多样性。例如，使用引物—模板双链体错配的 PCR，不但可以扩增相关序列，还可扩增未知特性的序列。还可设计扩增巨大正常基因背景下有单碱基选择性改变的少量突变基因。

PCR 的可变性大大简化了分子生物学操作。要改变特殊模板序列，过去需要若干步骤，现在用少量操作即可完成。在合适的条件下容许在引物—模板双链体的 3′末端和内部存在错配，因此可把点突变和期望的限制性内切酶位点直接引入引物内。同样，也可用类似的方式通过引物把核苷酸的缺失和插入引入扩增产物中。

简并引物使得相关然而又不同的核酸序列，以及只知道氨基酸序列的靶目标的扩增成为可能。下面简要介绍一些关键参数和具代表性应用的指导。

1. 简并引物

一些 PCR 应用不但要求引物容许错配，还要引物能与未知序列结合。由于遗传密码的简并性，一个给定的氨基酸可能由不同的密码子编码。编码每种氨基酸的密码子数目列于表 5.1 中。简并引物是将可能编码一给定氨基酸序列的核苷酸组合设计为一组。简并寡核苷酸链可独立合成，然后混合为库或者在 DNA 合成仪的程序中在一个位置上放置多个核苷酸。由于封闭碱基稳定性的不同，应注意使用新鲜的试剂以保证简并引物合成的可重复性及等量合成。一给定引物库的简并度可通过每一位置可能的核苷酸数相乘得到。例如，"AlaAsnIleLysMet" 的引物库简并度为 4×2×3×2×1＝64（编码简并度：Ala＝4，Asn＝2，Ile＝3，Lys＝2，Met＝1）。从氨基酸序列得到的混合寡核苷酸引物可用来扩增基因组 DNA 或 cDNA 的特异序列，然后依次作为探针筛选基因组或 cDNA 文库得到相应克隆。当只知道要寻找基因的小部分蛋白序列时，这是一个获得 DNA 探针的非常有用的技术。基于氨基酸序列保守区域设计的简并引物也用于搜索一个基因家族中的成员、不同物种的同源基因或相关病毒。

表 5－1　密码子简并度

密码子数目	氨　基　酸
1	Met，Trp
2	Phe，Tyr，His，Gln，Asn，Lys，Asp，Glu，Cys
3	Ile
4	Val，Pro，Thr，Ala，Gly
6	Leu，Ser，Arg

设计简并引物时，一定要检查靶扩增区域选定氨基酸遗传密码的简并度。很显然，我们期望选择简并度最低的氨基酸，因为这样特异性最好。可考虑用如下几种方法提高使用简并引物的扩增特异性：

（1）引物库可合成为若干亚套使得 1 个库中某一特写位置包含 1 个 G 或者 C，而另一个在同一位置包含

1 个 A 或者 T。

(2) 混合引物的简并度可利用密码子的翻译偏性得到降低。

(3) 简并引物可短到 4～6 个氨基酸密码子的长度。可在 5′末端连上包含限制性酶切位点的 6～9 个碱基以使便于作克隆。

(4) 应避免引物 3′末端的简并，因为单碱基错配会阻碍延伸。除非是 Met 或 Trp，末端密码子的最后一个碱基可以省略。

(5) 在一些多义位置使用脱氧次黄苷可降低引物库的复杂性。

次黄嘌呤核苷正常出现在一些 tRNA 反密码子的摆处，在翻译过程中能与 A、C 和 U 配对。几个实验认为脱氧次黄嘌呤核苷可能是一个“无效”碱基；它在一段寡核苷酸序列中的存在好像既不妨碍 DNA 双链体的形成，也不影响其稳定性。不考虑序列影响的情况下，碱基对稳定次序为 I：C＞＞I：A＞I：T≈I：G (Martin et al. 1985)。包含脱氧次黄嘌呤核苷的引物已成功地用于根据多肽序列扩增 cDNA 或基因组片段得到 DNA 探针 (Schuchman et al. 1990；Aarts et al. 1991)。脱氧次黄嘌呤核苷一般以 3～4 倍量掺入碱基位置。这种方法对有大量简并密码子的蛋白质是很有用的。模板中的次黄嘌呤核苷通常指导 C 的掺入。

已观察到 PCR 的热力学框架很显著地改变简并 PCR 的成功率 (Compton 1990)。选择的简并 PCR 扩增框架先在非严谨退火温度 (35℃～45℃) 下进行 2～5 个循环，随后在较严谨的退火温度下进行 25～40 个循环。缓和的退火条件使得引物的短互补区域与靶序列杂交。扩增 2 个循环以后，5′端延伸部分掺入扩增产物内作为后续扩增循环的模板。通过转换到较严谨的退火温度，可达到提高特异性的目的。而且，若在退火和延伸温度间安排 4 或 5min 的爬升时间也可获得更高的特异性。

2. 诱变引物

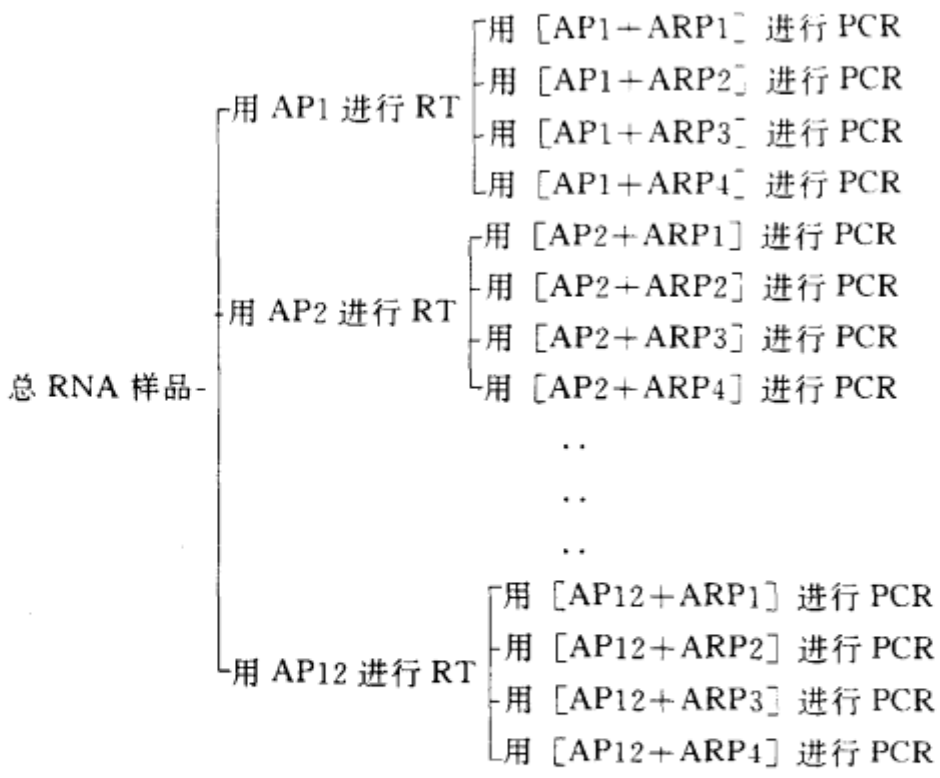
通过 PCR 的错配引物产生突变有几大优势：①在引入的突变类型方面，PCR 有充分的可变性。例如：单碱基替换、不同大小的缺少和插入都可通过一到两轮 PCR 容易地得到；②PCR 产物中感兴趣部分的突变可通过单一步骤克隆入任何一个期望载体中；③几乎所有的克隆都含有预期的突变。

突变碱基在引物中的位置依赖于所期望突变的性质。若要在一单一限制性酶切位点附近引入单碱基替换或插入，只需要两个引物 (图 5.2A)。一个带有预期突变酶切位点 (位点 X) 的错配诱变引物 (P1) 与另一个带有第二个限制性酶切位点 (位点 Y) 的引物 (P2) 配对进行 PCR。错配应位于一个 24 或 36 碱基寡核苷酸链的中间。PCR 产物可经酶 X 和 Y 消化后克隆入合适的载体内。若想在附近没有方便的限制性酶切位点的序列内产生突变，则需要两套引物进行两轮 PCR (图 5.2B)。引物 1 (P1) 与诱变引物 P2 搭配，诱变引物 3 (与 P2 互补) 与引物 4 搭配，在第一轮中分别用于两个 PCR。然后，将两种 PCR 产物 (或凝胶纯化 PCR 产物) 混合，少部分 (1/20～1/50) 在引物 1 和 4 存在的情况大段缺失和融合序列的引入也可以类似的方式完下进行第二轮 PCR 扩增。由于第一轮 PCR 产物中含有“诱变端”重叠序列，经过变性和退火后得到的两个部分配对双链体的一个作为第二次 PCR 的模板。第二次 PCR 扩增产物用来进行克隆。

用来产生大段缺失的诱变引物应该包括缺失区域的侧翼序列 (图 5.2C)。两个诱变引物 (P2 和 P3′) 应该在 3′末端有一段大于 12 碱基的与靶序列配对的区域及一个大于 7 碱基的、与缺失另一端侧翼序列配对的错配尾巴。两个第一轮 PCR 产物的诱变端重叠序列的长度是由引物 P2 和 P3 尾部的总碱基数目决定的。为了连接两个靶序列，诱变引物的错配尾巴的长度应大于 12 个碱基 (图 5.2D)。图 5.2B～D 中引物 1 和 4 是位于用来克隆 PCR 产物的限制性酶切位点的区域中。另外，用来进行克隆的限制性酶切位点可由包含该限制性位点序列和几个额外碱基的引物引入，以保证酶在 5′端的顺利消化。

这些实验中使用的引物长度依赖于序列中的 G/C 含量及期望的突变类型。通常 3′末端 12～14 个完全互补的碱基已足以完成引物的退火和延伸 (Tm 约 40℃)，特别是 AT 含量不是特别多时更是如此。此外，也可通过控制退火温度来进行有效的扩增。

如果突变片段的核酸序列有必要进行进一步的序列分析，图 5.2A 中引物 2 和图 5.2B～D 中的引物对 P1/P4 的位置应尽可能接近诱变引物，以最大限度地减少需要由测序确定核酸数目。应该注意最大限度降低 TaqDNA 聚合酶错误掺入的条件，诸如 dNTP 和 $MgCl_2$ 的浓度。使用时要仔细地优化反应条件，诸如 dNTP 和 $MgCl_2$ 浓度、pH 值之类的 PCR 反应参数都对酶的忠实性有影响。要很好地控制模板数量和扩增循环以减



材料、试剂和仪器

1. 材料

2 种或 2 种以上所要比较的植物组织或细胞的总 RNA 样品（质量要高），但一般不超过 5 种，每种总 RNA 样品最少需 2μg。

2. 试剂

1）主要试剂由 HIEROGLYPH™ mRNA Profile kit for Differential Display Analysis 提供。这个系统包括 5 个差异显示分析试剂盒，每个可以提供约 20%的 mRNA。每个 kit 提供一套：

12 个 3′端“锚定”引物（2μmol/L）

4 个 5′端“随机”引物（2μmol/L）

dNTP 混合液（每种 250μmol/L）

RNA 标准样品（Hela Control RNA，1μg/μl），用以证实反转录过程

注：每个“锚定”引物中包含了一个 T7 启动子（ACGACTCACTATAGGGC），它可允许从 3′端进行测序，故锚定引物的通式为（5′）T7（dT12）APn（n＝1～12）（3′）；每个随机引物中包含一个 M13 通用反向（－48）引发序列（ACAATTTCACACAGCA），它允许从 cDNA 片段之 5′端的测序位点进行直接测序，故随机引物的通式为：（5′）M13r－ARPn（n＝1～20）（3′）

2）此外还需下列试剂：

（1）反转录酶：如 SuperScript™ II RNase H⁻ Reverse Transcriptase（200U/μl）

（2）耐热的 DNA 聚合酶：如 Ampli Tag® DNA Polymerase（5U/μl）

（3）RNA 酶蛋白质抑制剂（RNasin Ribonuclease Inhibitor，Promega 公司）

（4）[α－^{33}P] dATP（1000～3000Ci/mmol/L）

（5）样品上样缓冲液：

95%去离子的甲酰胺

20mmol/L EDTA

0.05%溴酚蓝

0.05%二甲苯青 FF

（6）无核酸酶的无菌水

（7）无 RNA 酶的 DNA 酶 I（RNase－free DNaseI）

（8）cDNA 片段再扩增引物：

M13 反向（－48）24－mer（5′AGCGGATAACAATTTCACACAGGA3′）

T_7 启动子 22－mer（5′GTAATACGACTCACTATAGGGC3′）

（9）酚/氯仿（V：V＝1：1，pH5.2）

（10）100％乙醇和 70％乙醇

3. 仪器

（1）可调式水浴锅

（2）PCR 仪

（3）移液器（1～1000μl）和各种 Tip 头

（4）微量离心机和微量 Ep 管

（5）0.5mL Ep 管

（6）紫外分光光度计

（7）genomyxLR DNA 测序仪

实验程序

1. 对 RNA 样品的检测和处理

总 RNA 样品的质量是决定该实验成败最为关键的因素之一，故首先应对 RNA 样品的质量作进一步的检测。除要求其完整性良好并且必须满足 $A_{260}/A_{280}\geqslant 1.8$ 外，还必须将其中存在的痕量 DNA 除去。因痕量污染的 DNA 也会被扩增，并对 DD 带型造成假阳性。处理的方法是用 RNase－free DNaseI 处理。其步骤如下：

（1）在总 RNA 样品（25μg 总 RNA 溶于 25μl Nuclease－free 的水）中依次加入下列试剂并小心混匀：

1mol/L Tris·HCl（pH7.5）	2.5μl
25mmol/L $MgCl_2$	20μl
RNase－free DNaseI（2U/μl）	2μl

（2）37℃温育 20min；

（3）加入 200μl 酚/氯仿（V：V＝1：1，pH5.2），快速混匀 10s，4℃时以最大速度（13 000rpm）离心 15min。转移上层水相至另一新管中；

（4）在移出的上层水相中加入 1/10 体积的 3mol/L NaAc（pH5.2）和 2.5 倍体积预冷的 100％乙醇，混匀后置－70℃冷却 30min 或－20℃冷却 2hr 以上；

（5）4℃，12 000g 离心 15min；

（6）弃上清，用预冷的 70％乙醇洗沉淀 2 次（注：RNA 沉淀可能很难看见）

（7）4℃，12 000g 离心 10min，轻轻移去乙醇，并空气干燥沉淀，（大约 10～15min，注意要确保不能有残余的乙醇留下）。将 RNA 重新溶解在 20μl 无菌、无核酸酶的水中。

（8）取 2μl 溶解的 RNA 并稀释 100 倍（或 250 倍），紫外分光光度法检测 OD_{260}和 OD_{280}（检测前将已稀释的 RNA 在 65℃下加热 5min，以确保 RNA 的二级结构不影响测定值），OD_{260}/OD_{280}应该大于 1.8；

（9）取 1μgRNA，在 0.8％琼脂糖，1×TAE 的凝胶进行电泳检测（电压 80V，时间

20min)。如发现 RNA 稍有降解，便不能用于 DDRT—PCR；

(10) 获得高质量的 RNA 样品后，每 5μg 为一小份贮存于－70℃（浓度至少为 1μg/μl)；

(11) 在使用前，用无菌、无 RNA 酶的水将 RNA 样品稀释至 0.1μg/μl，置于冰上待用。

2. cDNA 第一条链的合成（反转录反应：RT rxns）

该程序是分别利用 12 个 Oligo (dT) 锚定引物和每个总 RNA 样品的等份获得每个 RNA 样品的 12 个第一链 cDNA 群体。要消耗每个总 RNA 样品 2.4μg。另外必须注意：所有的 DD—PCRs 的完成必须设置一个重复，以证明其可重复性。

(1) 在冰上融化下列试剂并一直将其置于冰上：

RNA 样品

APs（锚定引物）

dNTP 混合液

Hela RNA

5×Super Script II RT First Strand Buffer

DTT

Super Script II RT 酶（要一直贮于－20℃，使用时方可取出）

(2) 用 0.2mL 的薄壁 PCR 管或 0.5mL 的 PCR 管作为 RT 反应管（每个锚定引物为一个 RT rxn)，另外还需准备一套正对照反应管 [这是用标准样品 RNA (Hela Control RNA)（需稀释至工作浓度 0.1μg/μl) 和每个锚定引物 (AP) 反应]。

(3) 在一套适当的 RT 反应管中加入下列物质：

总 RNA 样品 (0.1μg/μl)	2.0μl
T_7 (dT12) AP 锚定引物 (2μmol/L)	2.0μl

小心混匀并稍离心。70℃温育 5min，然后置冰上快速冷却。稍离心将管内物质收集于管底。

(4) 在冰上按下表所列建立核心混合液 (RT core mix)，混合液的量要根据 RT 反应的数量来决定。

RT 核心混合液 (RT core mix)	1×rxn Vol. (20μl)
5×Super Script II RT buffer	4.0μl
250μmol/L dNTP 混合液 (1∶1∶1∶1)	2.0μl
100mmol/L DTT	2.0μl
Super Script II RT 酶 (200U/μl)	0.2μl
无菌、无 RNA 酶的水	7.8μl

将 16μl 核心混合液 (RT core mix) 加入步骤 (5) 中的①③②①的各个反应管中，混合均匀并稍离心。

(5) 在 PCR 仪中完成 RT 反应（注：可以对下面的反应条件进行修改，以提高 cDNA 第一链合成的特异性）

①42℃	5min
②50℃	50min
③70℃	15min
①40℃	保持

(6) 贮存于－20℃，以备 DD—PCR 所用。

$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$	16.100g/L
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	5.500g/L
KCl	0.75g/L
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.246g/L

调 pH 至 7.0 高压灭菌。

(5) X－gal 贮液

溶 X－gal 于 N，N－二甲基甲咪（DMF）中，至终浓度 20mg/mL，－20℃保存。

(6) Z buffer/X－gal 溶液（新鲜配制）

Z buffer	100mL
β－巯基乙醇	0.27mL
X－gal 贮液	1.67mL

3. 仪器

超净工作台，培养箱，摇床，恒温水浴，台式离心机，微量移液器，低温冰箱，紫外分光光度计

实验步骤

1. 合成含至 3 个靶序列（顺式元件）的核苷酸序列

2. 将靶序列插入到报道载体（pHISi，pHISi－pLacZi）的报道基因上游

3. 将构建好的顺式元件，报道载体整合进 YM4271 酵母基因组

1）从顺式元件—报道载体菌株中提取质粒

2）用质粒转化处于感受态的酵母菌。

4. 检验酵母中报道载体的本底表达，选用低本底表达的酵母菌作为报道株，His 质粒载体整合到 LacZ 报道菌株构建双元载体

5. 扩增 AD/文库，筛选 AD 融合文库

1）参照 MATCHMAKER 文库策略进行 AD/cDNA 文库的扩增，纯化文库 DNA。

2）感受态酵母报道菌的制备

(1) 挑取直径 2～3mm 的几个菌落于 1mLYPD 的锥形瓶中，剧烈振荡，把菌落分开。

(2) 将细胞悬浮液转移至含 50mL YPD 中，至平台期（OD＞1.5）。

(3) 将足量过夜的菌液转至 300mL YPD 中，使 OD＝0.2～0.3。

(4) 30℃，230rpm 摇菌 3hr。

(5) 室温下，1000g 离心 5min。

(6) 弃上清，细胞沉淀加入 25mL TE buffer，悬浮振荡。

(7) 将细胞收集于一管，室温下，1000g 离心 5min。

(8) 细胞沉淀悬浮于 TE/LiAc，终体积至 1.5mL，混匀。

3）感受态酵母菌的转化

(1) 在无菌的 50mL 管中加入 20μgAD/cDNA 文库 DNA、2mg 携带 DNA，混匀。

(2) 加入 1.0mL 报道菌株，混匀。

(3) 加入 6mL，LiCl/PEG，剧烈振荡 10s，混匀。

(4) 30℃，200rpm 摇菌 30min。

(5) 加入 70μl DMSO，轻轻颠倒混匀。

(6) 42℃水浴中热激 15min，旋动混匀，于冰上冷却 2min。

(7) 室温下，1000g 离心 5min。

(8) 弃上清，沉淀悬浮于 2 个 50mL 管中的 2×50mL SD/－His 液体培养基中。

(9) 30℃，200rpm 摇菌 1hr。

(10) 室温下，1000g 离心 5min。

(11) 弃上清，悬浮沉淀于 7mL TE buffer 中，使其终体积为 7.5mL。

(12) 取 10μl 悬浮好的细胞加入 1mL TE buffer 中稀释，取 200μl 的稀释液在 SD/Leu 培养基上铺板，确定转化频率。

(13) 取 500μl 稀释液在 SD/Leu/－His/加适量浓度 3－AT 培养基上铺板。

(14) 30℃温育 4～6 天。

(15) 挑大的菌落在 SD/Leu/－His/加适量浓度 3－AT 培养基上划线。

6. β－半乳糖苷酶活性的鉴定

(1) 在含 1.75mL Z buffer/X－gal 溶液、直径为 100mm 的培养皿中各浸泡一张无菌的 5mm Whatman #5 或 VWR 级 4131 滤膜。

(2) 在每个含转化子的琼脂板上覆盖一无菌、干燥的滤膜。

(3) 用牙签透过滤膜在琼脂板上 3 个不对称的位置穿孔。

(4) 用镊子小心把滤膜取下，使菌落向上置液 N_2 中浸泡 10s。

(5) 取出滤膜，置室温下使之融化。

(6) 将滤膜菌落向上，置于预先浸泡的滤膜上，两滤膜之间不要留气泡。

(7) 将滤膜置于 30℃或室温下，0.5～8hr 内观察出现的蓝色菌落。

7. 酵母质粒的提取

(1) 将每个菌落接种在 50mL SD/Leu＋适量浓度 3－AT 的液体培养基中。

(2) 30℃，200rpm 摇菌至少 2hr。

(3) 室温下，1000g 离心 5min。

(4) 弃上清，振荡，使沉淀悬浮于 200μl 酵母裂解缓冲液中。

(5) 加入 200μl 酸洗玻璃奶，20μl 酚：氯仿：异戊醇 (25：24：1)。

(6) 以最高速振荡，使细胞破碎。

(7) 室温下，14 000rpm 离心 10min。

(8) 转移上清到一洁净的 1.5mL 管中，加入 1/10 体积的 3mol/L NaAc，1μl 糖原，2.5 体积乙醇沉淀质粒。

(9) 置于－70℃，30min。

(10) 14 000rpm 离心 10min。

(11) 用 70%乙醇洗沉淀，干燥。

(12) 将沉淀重悬浮于 20μl TE buffer 中。

思考题

1. 为什么要用含多个靶序列的串联拷贝构建靶－报道载体？

2. 3－AT 在本实验中起什么作用？请设计实验确定其适量浓度。

参考文献

1. MATCHMAKER One－Hybrid System Protocol (PT1031－1)

2. [美] F. 奥斯伯, R. 布伦特, R.E. 金斯敦等. 1998. 精编分子生物学实验指南, 442～477
3. 陈晓红, 印莉萍, 1999. 结合于GATA元件的Ⅲ型锌指蛋白1, 生命的化学, 19 (4): 179～180
4. 颜芳, 印莉萍, 刘祥林, 1999. 缺铁胁迫下AFT1的研究进展, 微生物学报, 26 (5): 361～362

(陈晓红 刘强)

6.5 异源互补法筛选低丰度的基因

最早克隆的植物基因是那些mRNA丰度高的基因, 如根瘤的豆血红蛋白的转录本和正在发育的种子的储存蛋白的转录物。克隆丰度稍低的基因, 要加强专一性, 改变技术路线。一般可纯化兴趣目的蛋白, 用已纯化的抗体直接从cDNA表达文库中筛选cDNA或免疫沉淀聚核糖体RNA (polysomal RNAs)。不过, 构建cDNA文库前先要进行富集处理。另外, 只要有微量蛋白被测序, 也可以合成相应的DNA寡核苷酸作为引物去合成相应的cDNA或作为探针在cDNA文库或基因文库中去杂交筛选。

要分离极少转录本的基因, 较为简单的办法是cDNA表达文库转化大肠杆菌或酵母细胞(*E. coli*)的auxotrophic突变体的异源互补法。这种方法最初是由Davidson和Niswander提出的, 并用于从缺少aspartate carbomoyl transferase *E. coli* pyrB的突变体中通过功能互补获得仓鼠的cDNA。这种原则在编码所有细胞看家酶的基因上都得到满意的回答。然而, 有些真核细胞的酶需有翻译后加工, 是不能应用*E. coli*异源互补法的。另外, 有些酶是以异源复合物的形式被激活, 不能被单一的cDNA编码。另一种可能的困难是, 用于互补的表达文库一般产生融合多肽, 有些酶不能忍受任何N－端的延伸。尽管如此, 它的筛选效率比抗体或杂交高2～3倍, 尤其是对那些非常不容易被纯化或不稳定的蛋白(如膜蛋白等)来说, 更是如此。

至今, 用*E. coli*的异源互补法已分离得到的基因有玉米的PEP (phosphoenolpyruvate carboxylase), 玉米的GS (glutamine synthetase), 豌豆的GS和豌豆的P5CR (Δ^1－pyrroline－5－carboxylate reductase)。在植物氨基酸生物合成途径中涉及到的酶含量不高, 并且纯化很困难, 故对这些合成途径的研究进展不大。但利用了异源互补法后, 相继分离了脂肪、碳水化合物、核酸和维生素代谢中编码这些代谢酶的基因。而后, 为了解决不能对植物基因进行蛋白后加工修饰的问题, 人们发展应用了酵母突变体的异源互补法, 成功的例子有拟南芥菜NH_4^+－transporter的克隆和鉴定等。此技术可以用于分离编码转运蛋白的基因。其步骤为, 首先构建一个诱导的cDNA表达文库, 同时, 要找到缺失兴趣目的基因的酵母突变体; 第二步则是用质粒文库转化突变体细胞; 最后通过特异营养培养基进行筛选。

6.5.1 cDNA表达文库的构建 (见4.1)

6.5.2 突变型 (auxotroph) 细胞的转化

材料、试剂和仪器

1. SOB medium (per liter)

0.58g NaCl

实验程序

1. 包被

把抗原（或抗体）在碱性条件下，使其吸附在酶标板载体表面的过程。一般是把一定浓度的抗原溶解在 pH9.6 的碳酸缓冲液中，每个孔加入后，4℃过夜或室温～37℃放置 2hr。

2. 漂洗

去除残余物，将松散的或非吸附的物质漂洗掉。一般用 1%Tween～20 250 μl/孔，洗 3 遍。

在以后的各步间，均要进行漂洗。

3. 封闭

用无关蛋白质将各孔内的空位点占据，以减少或消除非特异性吸附。一般是在缓冲液中加入牛血清白蛋白，酪蛋白等，将这种高浓度蛋白加入每孔 200 μl 37 ℃放置 1hr。

4. 竞争

取一定量的抗体与样品混合，样品中的待测物（抗原）会特异地与抗体反应。然后取一定量的混合液加到细胞反应板的孔中，混合液中剩余的抗体再与吸附在孔内的抗原反应，根据抗原被抗体的消耗量，计算样品中待测物的含量。

5. 加二抗

二抗指辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG，二抗能特异地与孔内的抗体（一抗）反应。

6. 显色

在各孔内加过氧化物酶的底物邻苯二胺(OPD)或四甲基联苯胺。在少许 H_2O_2 的作用下，37℃保温 15min，加 100 μl 2N H_2SO_4 终止反应。

置酶标仪上测定 O.D_{492}值。

结果分析

现以植物激素 ELISA 为例，谈谈操作程序中的一些实验要点，以供设计实验中考虑。

1. 包被

ELISA 使用广泛的固相载体是塑料（聚苯乙烯）微孔板，亦称细胞培养板，有 96 孔、55 孔、40 孔以及 24 孔等各种型号，国内产品质量较好的有上海塑料制品厂、天津有机玻璃厂、四川分析仪器厂（重庆）等厂家，其它载体形式有 8 联或 12 联或组装小杯条以及小珠子等。在建立实验方法的时候，推荐使用 40 孔板，而在实际测定时，则以 96 孔板最为方便。因为孔多，可以克服边缘效应，耐用，可测样品数多，重复也多。

聚苯乙烯孔板吸附蛋白质的性质是 ELISA 的基础。蛋白质是依靠非特异性的疏水力和塑料表面结合的，其等电点、电荷及分子量大小与结合无关，一般情况下的饱和吸附量为 1.5ng/mm^2，但有时也会形成双层或多层吸附，这些依赖蛋白质之间相互作用而产生的吸附也较松散，但对 ELISA 影响较大。这些现象在蛋白质等电点处发生较多。

不同厂家不同批次的产品在吸附性质上存在差异，而且在同一批板上也存在着一定的差异。对 ELISA 影响较大的是边缘效应（edgeeffect），即边缘孔比内孔吸附更多的蛋白质。造成这种情况的原因是一方面两者表面性质有差异，另一方面是由于周边与内孔的温差造成的，解决的方法是放弃周围孔，或者预热或在带鼓风条件的温箱中放置，都可以改善边缘效应。

影响蛋白质在塑料表面吸附的因素主要有 pH 值、温度、浓度和时间。通常应用的包被缓冲液是 pH 为 9.6 的碳酸缓冲液，其它的选择还有 pH 为 8.5，含 100mmol/L NaCl 的 10mmol/L Tris－NaCl 缓冲液和 PBS（pH7.2，含 100mmol/L NaCl 的碳酸钠缓冲液），甚至

蒸馏水也很好，对于某一特定的蛋白质来说，也说不定那种更好，可以用实验来确定。包被通常在 4 C 下过夜或室温下放置 2hr，一般能达到最大包被量，最适宜的包被浓度通常在 1～10 μg/mL，但这与包被物纯度有很大关系，例如在直接法 ELISA 中用抗血清直接包被和用纯抗体包被的浓度要相差 4～5 倍。

2. 洗涤

洗涤的目的在于清除残留的成分及松散的或非特异性的吸附。常用的洗涤液，有含 Tween－20 的 0.5%～5%的 PBS 盐水、蒸馏水甚至自来水，但安全有效而且便宜的洗涤液应当是蒸馏水－1%Tween－20，必要时可加 NaN_3（1%）防腐，有时添加 0.5mol/L NaCl 效果更好。通常洗涤时间每次不必太长，30s 足够。最后 1 次洗涤，即酶标物结合以后的洗涤步骤十分关键，必须洗涤彻底，因为很微量的非特异吸附的酶都会造成很大的误差。所以此次要比通常多洗 1～2 次。

3. 竞争

有时在此步骤之前，有一个封闭步骤，即用其它无关蛋白质将包被之后板上的剩余位点填满，避免以后步骤中抗体及酶标物的非特异性吸附，但实际试验证明此步并非必要。抗体缓冲液的 pH、离子强度等因素会影响抗原抗体的反应，一般都利用接近生理 pH（pH7.5 左右）的缓冲液作为缓冲系统，但某些抗原抗体反应的最适 pH 可能有所不同，例如抗 ABA－BSA 抗体与 ABA 的结合在 pH4～10 的范围内不受影响，而抗 ABA－C4－BSA 抗体与 ABA 的结合却在 pH6.5 时达到最大，pH 值低时则显著下降。这可能与羧基参与结合反应有关。因此，不同的抗原抗体反应所需的缓冲系统不尽相同，可以用试验确定。抗体稀释缓冲液中常添加 1%～10%的 BSA 或 0.1%的明胶、酪蛋白或 10%的正常兔血清，抗体稀释液保持溶胶状态，同时可以抑制抗体或其它干扰蛋白在板上的非特异性吸附。经验表明，高离子浓度可减小抗体的非特异性吸附，所以把 PBS 中的 NaCl 浓度提高到 0.5mol/L。另一常用的附加成分是 Tween－20，这是一种非离子型表面活性剂，作用是抑制依赖疏水键形成的非特异性吸附。竞争反应这一步，是我们进行定量的决定步骤，其理论基础是下述的平衡反应：

$$Ab+H+HP=AbH+AbHP$$

其中 Ab 表示抗体，H 表示游离激素，HP 表示吸附在板上的激素——蛋白质复合物。根据质量作用定律，当该反应体系中 Ab 及 HP 的量确定后，游离 H 越多，结合物 AbH 形成的就越少，即结合板上的抗体就越少，我们通过检测结合物 AbHP 的多少，来确定 H 游离量的多少，这是 ELISA 进行激素测定的基本原理。可以看出足够的反应时间对于达到真正的反应平衡很重要。

4. 二抗

所谓二抗，是指用辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG。向孔内加入二抗的目的是为了检测经抗原抗体反应而结合在板上的激素抗体。在此过程向抗体稀释液中添加 PEG－6000，是为了促进二抗与一抗的结合（从 2～3hr 缩短到 0.5hr），并提高显色值约 10%，但其作用机理不详。

5. 显色

这是最后的，也是最关键的一步。对于此步来说，尽管该酶稳定且适应性广泛，但是影响其显色的因素很多。首先是底物种类，常用的是邻苯二胺（OPD），由于该化合物具有致畸和致炎作用，属于危险试剂，人们又利用一种较安全的化合物四甲基联苯（TMB）作为 HRP 的底物，发现它显色更灵敏，比 OPD 高 15 倍，而且 TMB 可以配成储液保存，不必每次重配，

比较省事；第二个影响因素是H_2O_2的浓度，通常使用的H_2O_2的浓度偏高，会抑制过氧化物酶的活性，研究表明，底物溶液中含10 000^{-1}～12 000^{-1}的30%H_2O_2为最适浓度；HRP的最适反应温度是15℃，37℃下尽管反应速度很快，但酶容易失活，而在该底物溶液中添加0.1% Tween－20可以减少此效应；另外，pH值也是一个重要的影响因素，pH为5.0时反应最快，偏高或偏低都会严重影响显色。底物溶液中如果有重金属离子或NaN_3都会抑制酶的反应。

显色适当后（即终止后各孔显色O.D值能达到1.2～1.5而本底即完全抑制孔不超过0.1～0.2），可用50μl 2N或6N H_2SO_4终止。适用于酶联免疫测定比色的分光光度计为酶联免疫分光光度计，国内生产厂家较多，上海分析仪器一厂、南京华东电子管厂、四川分析仪器厂以及北京分析仪器厂都有生产，质量都还可以。目前国内比较先进的是华东电子管厂生产的DG3022A型，具有比较完善的电子设备，可辅助结果的记录和处理。

参考文献

1. 张龙翔等，1997，《生化实验方法和技术》，364～371
2. 江世益等，1996，《免疫化学》，174～177
3. 钱E昆等，1994，《实用免疫学新技术》，24～26

（刘祥林　印莉萍）

7.3.3 双向免疫扩散技术——平板法

抗原抗体反应是所有免疫化学的基础。抗原与其相应的抗体具有分子表面结合的特性，二者结合是有一定比例的，只有在分子比合适，并有电解质（如NaCl、磷酸盐、巴比妥盐）存在的条件下才可见到沉淀反应。扩散技术是抗原抗体反应中，观察其二级反应——沉淀现象的主要方法。抗原、抗体在凝胶中扩散，并进行沉淀反应，叫做免疫扩散反应(immunodiffusion)。将抗原与其相应抗体放在凝胶（如琼脂）平板中的临近孔内使它们相互扩散，当扩散到两者浓度比例合适的部位相遇时，即出现乳白色的沉淀线，这便称为双向免疫扩散实验。这一方法是由Ouchterlony（1948年）提出的，因此又称Ouchterlony技术。其基本原理是：抗原抗体在一定pH和离子存在的琼脂糖凝胶中相向扩散，一定时间后，两者相遇而形成不明显的抗原抗体聚合物并继续扩散，当扩散至两者的适当比例时便形成大的抗原抗体复合物而出现明显沉淀，形成垂直于扩散方向的免疫沉淀线即等价线。在沉淀线两侧由于不是抗原过剩，就是抗体过剩，而不出等价线。沉淀线形成的位置与抗原抗体浓度有关，抗原浓度越大，形成的沉淀线距离抗原孔越远。当固定抗体的浓度，稀释抗原，可根据已知浓度抗原沉淀线的位置测定未知抗原的浓度；反之，固定抗原的浓度，则可测定抗体的效价。因此，双向免疫扩散实验不仅可对抗原或抗体进行定性鉴定和测定效价，还可对抗原或抗体进行纯度分析和同时对两种不同来源的抗原或抗体进行比较，分析其所含成分的异同。

双向免疫扩散实验包括试管法和平板法，其中较常用的是平板法。

材料、试剂和仪器

1. 材料

抗原及其相应的抗体（血清）（或SDS－PAGE分离的蛋白抗原及其相应的抗血清）

2. 试剂

（1）1% pH8.6，离子强度为0.06的巴比妥缓冲液

实验结果分析

当样片颜色反应及部位观察清楚后立即进行显微彩色照相并记录分析酶定位的结果。

思考题

1. 说明所鉴定的酶在组织中的重要作用。
2. 如何使样片达到最清楚的效果？

参考文献

1. 郭季芳，1964，介绍植物组织中几种酶的定位鉴定方法，植物生理学通讯，2 期
2. 华东师范大学生物系植物生理教研组主编，植物生理学实验指导，187
3. F. H. 魏海姆等，植物生理学实验，71，159～163

（黄勤妮）

8.6 植物激素的提取和鉴定

植物激素是植物生长发育过程中不可缺少的物质，它们在植物体内的含量极微，在一定部位合成后，输送到作用部位，在植物生长发育的不同时期或阶段分别起着调节控制的重要作用。目前已知的植物激素有生长素（IAA）、赤霉素（GA）、细胞分裂素（CTK）、脱落酸（ABA）及乙烯（ETH）五大类。在内源激素的研究中，层析技术已作为检验与测定的不可缺少的分析工具。本实验通过对植物材料的破碎、萃取、减压浓缩、过柱等分离提纯技术，利用植物组织中的激素一般可用含有亲水基团的有机溶剂提取，然后通过弱碱性 DEAE－32 纤维素离子交换柱分离的原理，最后用硅胶薄层层析法进行纯化检验测定。

材料、试剂和仪器

1. 材料

花椰菜

2. 试剂

DEAE－纤维素、乙酸乙酯、甲醇、石油醚、0.05mol/L Na_2SO_4 溶液、1N HCl 溶液、pH 试纸、硅胶板（10×10cm）

展开剂：正丁醇：异丙醇：氨水：水＝2：8：1：1

或：异丙醇：氨水：水＝10：1：1

3. 仪器

薄膜旋转蒸发器 、组织捣碎器、薄层层析仪、分液漏斗、分离柱、紫外灯

实验程序

样　品（新鲜或低温冰箱保存）

↓ 研磨冰浴机中捣碎 30s，用 80%甲醇提取 3 次

提取液（抽滤，去残渣）

↓ 45℃减压浓缩至一半，去甲醇（薄膜旋转蒸发器）

水相提取液

↓加等量石油醚萃取，去绿色（脱色）

脱色的水相提取液

↓用 1NHCl 液调至 pH2.8～3

乙酸乙酯萃取三次（1∶1）

↓

有机相

↓45℃减压浓缩至蒸干

50%甲醇洗出液（40～50mL）

↓

DEAE－32 纤维素柱（先用 120mL dH_2O 平衡洗柱）

↓0.05mol/L Na_2SO_4 洗脱 170mL

洗脱液（弃开始流下的 50mL，收集后流下的 120mL）

↓1NHCl 液调至 pH2.8～3

乙酸乙酯萃取三次（1∶1）

↓45℃减压浓缩至蒸干

95%乙醇洗出液（准确 1～2mL）

↓点硅胶板（吸取乙醇提取液平均分配于起点的 3 个点上，另三个点分别点上标准激素溶液）

薄层层析

↓

紫外灯下观察（或仪器分析）

↓

ABA、IAA、GA

水相
（含细胞分裂素 CTK）

DEAE－32 纤维素柱的制备：

取 DEAE 纤维素粉，先浸于重蒸馏水中，漂去细粒，用布氏漏斗抽滤去水，然后移入烧杯，加 0.1N H_2SO_4 浸泡过夜。用布氏漏斗吸滤，再用重蒸馏水洗涤至 pH 接近中性。然后将处理好的纤维素粉装入直径 2cm 层析柱中，纤维素粉高约 20cm 备用。

结果分析

紫外光下可见到 ABA、IAA、GA 激素暗斑（与标准激素暗斑相对照）用铅笔圈画起来。

思考题

1. 使用所获得的植物为源激素如何进行生物鉴定？

2. 分析所提取的不同激素存在差异的原因。

参考文献

1. 上海植生学会编，1985，植物生理学实验手册
2. 增田芳雄等著，1976，植物激素（译本），科学出版社
3. 丁静等，1979，植物内源激素的提取、分离和生物鉴定，植物生理学通讯，第三期

（黄勤妮　刘祥林）

8.7 放射免疫分析法测定几种激素

放射免疫分析法（Radioimmunoassay RIA）的基本原理是建立在标记抗原（Ag＊）和非标记抗原（Ag）对限量的特异性抗体的竞争性结合反应。因标记抗原和非标记抗原的免疫活性完全相同，故与特异性抗体具有相同的亲和能力。竞争结合反应通常用下式表示：

$$Ag^{*} + Ab \leftrightarrows Ag^{*} - Ab$$

（标记抗原）（特异性抗体）（标记抗原－抗体复合物）

$$+$$

Ag（非标记抗原）

$$\uparrow\downarrow$$

$$Ag - Ab$$

（非标记抗原－抗体复合物）

从上述反应系统可以看出，当只有标记抗原和特异性抗体时，只产生 $Ag^{*}+Ab$ 复合物，并保持可逆的动态平衡。如在反应液中同时加入非标记抗原，因标记抗原和特异性抗体的量是已知的，并保持一定的比例，这样，形成的 $Ag^{*}+Ab$ 必然受 Ag 含量的制约。也就是说，由于是可逆反应，Ab 又是限量的，Ag^{*} 和 Ag 就要竞争其结合部位。Ag 的含量高，则形成的 Ag－Ab 多，Ag^{*}－Ab 就相应地减少。反之，如果 Ag^{*} 的含量高，则形成的 Ag^{*}－Ab 多，Ag－Ab 就相应的减少。这种竞争结合的逆函数关系应用于放免的实际工作中，就是用已知浓度的标准物和一定量的 Ag^{*} 及限量的 Ab 反应，分离后即可测出在该标准物质各浓度时的 Ag^{*}－Ab 复合物的结合百分率。以结合百分率为纵坐标，标准物质的浓度为横坐标绘成曲线，即为竞争抑制反应剂量曲线。未知样品在同样条件下测出其 Ag－Ab 复合物的结合百分率，再根据比值从标准曲线上求出相应的 Ag 的浓度。

8.7.1 血清或血浆孕酮放射免疫测定法

孕酮是一种重要的性激素，不仅在月经周期的调节中起重要作用，也是维持妊娠所必须的一种激素，建立一种敏感而简便的孕酮测定方法即放射免疫测定，对于临床诊断以及有关科学研究工作有重要意义。

孕酮放射免疫测定是根据理化性质相同的标记抗原（^{3}H－P）与非标记抗原（P）都能特异地与抗体（孕酮抗血清）结合形成复合物的原理，但它们之间起竞争作用，当抗体与标记抗原的量恒定时，随着 P 含量的升高，标记抗原—抗体复合物的生成就成比例下降，这样在

常用的电泳缓冲液

缓冲液	使用液	浓贮存液（100mL）
Tris－乙酸（TAE）	1×：0.04mol/L Tris－乙酸 0.001mol/L EDTA	50×：242g Tris 碱 57.1mL 冰乙酸 100mL 0.5mol/L EDTA（pH8.0）
Tris－磷酸（TPE）	1×：0.09mol/L Tris·磷酸 0.002mol/L EDTA	10×：108g Tris 碱 15.5mL 85%磷酸（1.679g/mL）40mL 0.5mol/L EDTA（pH8.0）
Tris－硼酸（TBE）*	0.5×：0.045mol/L Tris－硼酸 0.001mol/L EDTA	5×：54g Tris 碱 27.5g 硼酸 20mL 0.5mol/L EDTA（pH8.0）
碱性缓冲液**	1×：50mmol/L 氢氧化钠 1mmol/L EDTA	1×：5mL 10mol/L 氢氧化钠 2mL 0.5mol/L EDTA（pH8.0）
Tris－甘氨酸***	1×：25mmol/L Tris 250mmol/L 甘氨酸 0.1%SDS	5×：15.1g Tris 碱 94g 甘氨酸（电泳级） 50mL 10%SDS（电泳级）

*TBE 浓溶液长时间存放后会形成沉淀物，为避免这一问题，可在室温下用玻璃瓶保存 5×溶液，出现沉淀后则予以废弃。

以往都以 1×TBE 作为使用液（即 1∶5 稀释浓贮存液）进行琼脂糖凝胶电泳。但 0.5×的使用液已具备足够的缓冲容量。目前几乎所有的琼脂糖凝胶电泳都以 1∶10 稀释的贮存液作为使用液。

进行聚丙烯酰氨凝胶电泳使用的 1×TBE，是琼脂糖凝胶电泳时使用液浓度的 2 倍。聚丙烯酰氨凝胶垂直槽的缓冲液槽较小，故通过缓冲液的电流量通常较大，需要使用 1×TBE 以提供足够的缓冲容量。

**碱性电泳缓冲液应现用现配。

***Tris－甘氨酸缓冲液用于 SDS－聚丙烯酰氨凝胶电泳。

3.3　常用的凝胶加样缓冲液

缓冲液类型	6×缓冲液	贮存温度（℃）
（1）	0.25%溴酚蓝 0.25%二甲苯青 FF 40%（W/V）蔗糖水溶液	4
（2）	0.25%溴酚蓝 0.25%二甲苯青 FF 15%聚蔗糖（Ficoll）（400 型）水溶液	室温

续表

缓冲液类型	6×缓冲液	贮存温度（℃）
(3)	0.25%溴酚蓝 0.25%二甲苯青 FF 30%甘油水溶液	4
(4)	0.25%溴酚蓝 40%（W/V）蔗糖水溶液	4
(5)	碱性加样缓冲液 300mmol/L 氢氧化钠 6mmol/L EDTA 18%聚蔗糖（Ficoll）（400 型；Pharmacia） 水溶液 0.15%溴甲酚绿 0.25%二甲苯青 FF	4

使用以上凝胶加样缓冲液目的有三：①增大样品密度，以确保 DNA 均匀进入样品孔内；②使样品呈现颜色，从而使加样操作更为便利；③含有在电场中以预知速率向阳极泳动的染料。溴酚蓝在琼脂糖凝胶中移动的速率约为二甲苯青 FF 的 2.2 倍，而与琼脂糖浓度无关。以 0.5×TBE 作为电泳液时，溴酚蓝在琼脂糖中的泳动速率约与长 300bp 的双链线状 DNA 相同，而二甲苯青 FF 的泳动则与长 4 kb 的双链线状 DNA 相同。在琼脂糖浓度为 0.5%～1.4% 的范围内，这些对应关系受凝胶浓度变化的影响并不显著。

对于碱性凝胶应当使用溴甲酚绿作为示踪染料，因为在 pH 条件下其显色较溴酚蓝更为鲜明。

3.4 测序凝胶加样缓冲液

98%去离子甲酰氨　　0.025%二甲苯青 FF

10mmol/L EDTA（pH8.0）　　0.025%溴酚蓝

甲酰氨：许多批号的试剂级甲酰氨，其纯度符合使用要求，无须再进行处理。不过，一旦略呈黄色，则应在磁力搅拌器上将甲酰氨与 Dowex XG8 混合床树脂共同搅拌 1hr 进行去离子处理、并用 Whatman 1 号滤纸过滤 2 次。去离子甲酰氨分装成小份，充氮存于－70℃。有的公司出售经过蒸馏并充氮包装的甲酰氨，用前不必纯化。

附录 4　与 DNA 凝胶电泳有关的数据

4.1　琼脂糖凝胶浓度与线性 DNA 的分辨范围

凝胶浓度（%）	线性 DNA 长度（bp）
0.5	1000～30000
0.7	800～12000
1.0	500～10000
1.2	400～7000
1.5	200～3000
2.0	50～2000

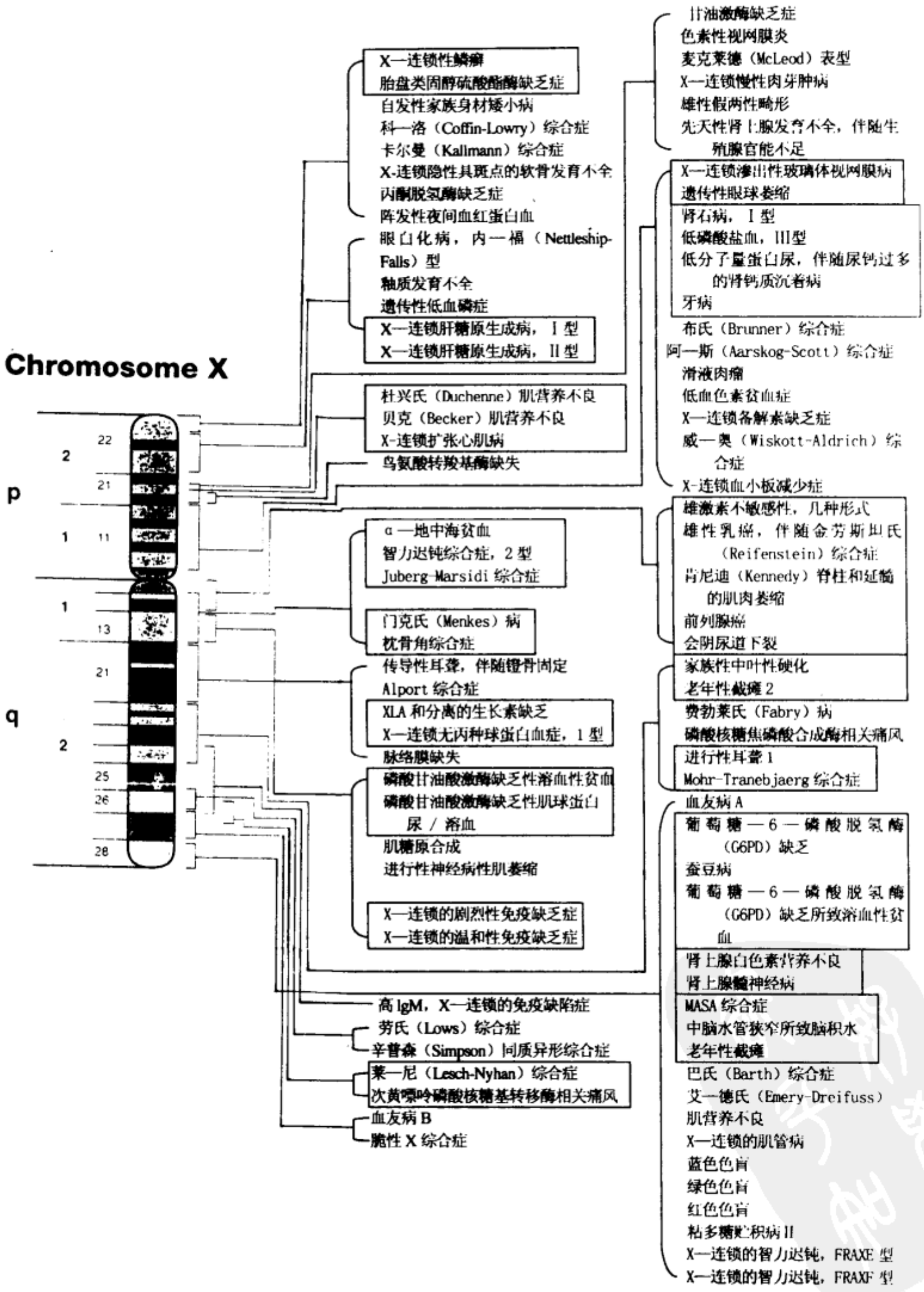
4.2　聚丙烯酰胺凝胶浓度与线性 DNA 的分辨范围

丙烯酰胺（% [W/V]*）	分辨范围
3.5	100～2000
5.0	80～500
8.0	60～400
12.0	40～200
15.0	25～150
20.0	6～100

* 其中含有 N，N′一亚甲基双丙烯酰胺，浓度为丙烯酰胺的 1/30

4.3　染料在非变性聚丙烯酰胺凝胶中的迁移速度

凝胶浓度（%）	溴酚蓝（bp）	二甲苯青 FF（bp）
3.5	100	460
5.0	65	260
8.0	45	160
12.0	20	70
15.0	15	60
20.0	12	45


Chromosome X
p
q
22
21
11
13
25
26
28
X—连锁性鳞癣
胎盘类固醇硫酸酯酶缺乏症
自发性家族身材矮小病
科—洛（Coffin-Lowry）综合症
卡尔曼（Kallmann）综合症
X-连锁隐性具斑点的软骨发育不全
丙酮脱氢酶缺乏症
阵发性夜间血红蛋白血
眼白化病，内—福（Nettleship-Falls）型
釉质发育不全
遗传性低血磷症
X—连锁肝糖原生成病，Ⅰ型
X—连锁肝糖原生成病，Ⅱ型
杜兴氏（Duchenne）肌营养不良
贝克（Becker）肌营养不良
X-连锁扩张心肌病
鸟氨酸转羧基酶缺失
α—地中海贫血
智力迟钝综合症，2型
Juberg-Marsidi 综合症
门克氏（Menkes）病
枕骨角综合症
传导性耳聋，伴随镫骨固定
Alport 综合症
XLA 和分离的生长素缺乏
X—连锁无丙种球蛋白血症，1型
脉络膜缺失
磷酸甘油酸激酶缺乏性溶血性贫血
磷酸甘油酸激酶缺乏性肌球蛋白尿／溶血
肌糖原合成
进行性神经病性肌萎缩
X—连锁的剧烈性免疫缺乏症
X—连锁的温和性免疫缺乏症
高 IgM，X—连锁的免疫缺陷症
劳氏（Lows）综合症
辛普森（Simpson）同质异形综合症
莱—尼（Lesch-Nyhan）综合症
次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶相关痛风
血友病 B
脆性 X 综合症
甘油激酶缺乏症
色素性视网膜炎
麦克莱德（McLeod）表型
X—连锁慢性肉芽肿病
雄性假两性畸形
先天性肾上腺发育不全，伴随生殖腺官能不足
X—连锁渗出性玻璃体视网膜病
遗传性眼球萎缩
肾石病，Ⅰ型
低磷酸盐血，Ⅲ型
低分子量蛋白尿，伴随尿钙过多的肾钙质沉着病
牙病
布氏（Brunner）综合症
阿—斯（Aarskog-Scott）综合症
滑液肉瘤
低血色素贫血症
X—连锁备解素缺乏症
威—奥（Wiskott-Aldrich）综合症
X-连锁血小板减少症
雄激素不敏感性，几种形式
雄性乳癌，伴随金芳斯坦氏（Reifenstein）综合症
肯尼迪（Kennedy）脊柱和延髓的肌肉萎缩
前列腺癌
会阴尿道下裂
家族性中叶性硬化
老年性截瘫 2
费勃莱氏（Fabry）病
磷酸核糖焦磷酸合成酶相关痛风
进行性耳聋 1
Mohr-Tranebjaerg 综合症
血友病 A
葡萄糖—6—磷酸脱氢酶（G6PD）缺乏
蚕豆病
葡萄糖—6—磷酸脱氢酶（G6PD）缺乏所致溶血性贫血
肾上腺白色素营养不良
肾上腺髓神经病
MASA 综合症
中脑水管狭窄所致脑积水
老年性截瘫
巴氏（Barth）综合症
艾—德氏（Emery-Dreifuss）肌营养不良
X—连锁的肌管病
蓝色色盲
绿色色盲
红色色盲
粘多糖贮积病Ⅱ
X—连锁的智力迟钝，FRAXE 型
X—连锁的智力迟钝，FRAXF 型

附录 10 酵母遗传学命名法

用于酵母遗传学早期介绍的命名法及其规则已由 Sherman 和 Lawrence（1974）以及 Sherman（1981）作了概述。即用三个斜体字母命名（例如：arg）。与 Demerec 等（1966）提出的标准相反，遗传学基因座通过跟在基因符号后的一数字（而不是字母）来表示，如：arg2。显性等位基因通过使用基因符号的三个斜体大写字母来表示，如：*ARG*2。左下角小写字母则代表隐性等位基因，如：营养缺陷型 *arg*2。野生型基因用一个右上角带＋的符号表示，如 *sup*6$^+$ 和 *ARG*2$^+$。用一个连字符将一个数字与一个基因座标记隔开的方式表示该座位上的等位基因，如：*arg*2-14。座位序号应与原来的标记一致，但等位基因的序号可因不同实验室而异。

表型的名称通常用右上角带有＋或－的罗马字的相应基因标记表示，如：用 Arg$^+$ 和 Arg$^-$ 分别表示精氨酸非依赖型和精氨酸依赖型。

举例说明了用于酿酒酵母遗传学命名的规则：

*ARG*2	一个基因座或显性等位基因
*arg*2	一个产生依赖精氨酸作为表型的基因座或隐性等位基因
*ARG*2$^+$	该基因的野生型等位基因
*arg*2-9	一个特异等位基因或在 *ARG*2 基因座突变
Arg$^-$	一个不依赖精氨酸的菌株
Arg$^-$	一个依赖精氨酸的菌株
*Arg*2*p*	表示 *ARG*2 基因的蛋白质产物

此外，还有一些特殊规则。基因簇、同一基因内的互补群或一个基因中具有不同特性的区域可以用带有大写字母的相应基因座标记表示，如：*his*4*A*、*his*4*B*。

随着酵母重组 DNA 技术的广泛应用，出现了一种适合于基因插入、基因融合和质粒命名的方法：

*ARG*2：：*LEU*2	*LEU*2 基因插入 *ARG*2 基因座，但插入的位置没有破坏 *ARG*2 的功能
arg2：：*LEU*2	*LEU*2 基因插入 *ARG*2 基因座，但插入的位置破坏了 *ARG*2 的功能
arg2-101：：*LEU*2	*LEU*2 基因插入 *ARG*2 基因座，但插入的位置破坏了 *ARG*2 的功能且标明了被破坏等位基因的位置
*cycl-arg*2	*CYC*1 和 *ARG*2 两个基因发生了融合，融合后的两个基因都是无功能的
P_{CYC1}-*ARG*2	*CYC*1 基因启动子和 *ARG*2 基因的融合体，融合后的 *ARG*2 基因是有功能的
[Ycp-*ARG*2]	携带一个有功能 *ARG*2 基因座的着丝粒质粒
[Pck101]	表示一个具体的质粒，其结构可查资料

尽管应尽量避免使用上标，但有时为了方便也分别使用右上标 R 或 S 来区分抗性或敏感基因。例如：控制刀氨酸硫酸抗性（*can*1）和硫酸铜抗性（*CUP*1）的基因及其敏感等位基因

可分别用 can^R1 CUP^R1 CAN^S1 和 cup^S1 表示。

交配型和相关基因座的野生型和突变型等位基因的命名法并不遵循上述标准规则。交配型基因座的两种野生型等位基因用 *MAT*a 和 *MAT*α 表示；*MAT*a 的两个互补群用 *MAT*a1 *MAT*a2 表示；*MAT* 基因的突变基因用 *mata*-1*mata*1-1 表示；*HMR* 和 *HML* 基因座的野生型同宗配合等位基因用 *HMR*a、*HMR*α、*HML*a、*HML*α 表示。这些基因座的突变型基因用 *hmr*a-1、*hmr*α-1 表示。*MAT*a 和 *MAT*α 细胞的交配表型分别用简单 *a* 和 α 表示。显性和隐性抑制基因应分别用带有基因座序号的 3 个大写字母或 3 个小写字母表示，如：*SUP*4、*SUF*1、*sup*35、*suf*11。在一些情况下，UAA 抑制基因和 UAG 抑制基因还要分别在基因座序号后加上 0 和 *a*。例如：*SUP*4-o 代表 *SUP*4 基因座的抑制基因，它将酪氨酸残基插入 UAA 位点；*SUP*4-*a* 同样代表 *SUP*4 基因座的抑制基因，但它将酪氨酸残基插入 UAG 位点。相应编码正常的酪氨酸 tRNA 并且无抑制活性的野生型座位可以用 sup_+ 表示。因此，酵母中抑制基因及其野生型等位基因的命名法与细菌的命名法无关。例如：用 su_+ 表示一种大肠杆菌赭石抑制基因，它可将酪氨残基同时插入 UAA 和 UAG 位点；而用 su_+、su_+ 或 *supC* 表示编码正常酪氨酸 tRNA 且无抑制活性的野生型等位基因。

对于大多数编码蛋白质的结构基因而言，有功能的野生型等位基因通常突变型基因为显性。酵母中，习惯使用斜体符号如：*HIS*4、*LEU*2 来表示显性基因。因为，通常使用隐性突变位点进行遗传作图，而已发表的染色体图谱通常含有某基因的突变型。例如：染色体 Ⅱ 含有 *his*4 和 *leu*2，而染色体 Ⅳ 含有 *SUP*2 和 *FLD*1。由于大写字母被用来代表控制相同性状的显性野性型基因（如 *SUC*1，*SUC*2）而遗传作图时使用基因的显性形式，所以在遗传图谱中，那些染色体基因座用大写字母表示。此外，使用重组 DNA 技术与经典作图相结合的方法已经对某些 DNA 片段进行了定位，大写字母也用来为这些 DNA 片段命名，如：RDN1，一种编码核糖体 RNA 的片段。

引自：[美] A. 亚当斯，D. E. 葛特矢林，C. A. 凯泽，等，2000，酵母遗传学方法实验指南，科学出版社。

附录 11　缩略语表

AD　activation domain	转录激活结构域
AFT1　activator of ferrous transport	铁转运激活子
AHA　Arabidopsis H^+－ATPase	拟南芥的 H^+-ATP 酶
AP　alkaline phosphatase	酸性磷酸酶
AP　anchored primer	3′-端锚定引物
AP　ammonium persulfate	过硫酸铵
Ap　ampicillin	氨苄青霉素
ARP　arbitrary primer	5′-端锚定引物
ARS　autonomously replicating sequence	自主复制序列
BCIP　5-bromo-4-chloro-4-indolyl phosphate	5-溴-4 氯-3 吲哚磷酸
BD　DNA binding domain	DNA 结合结构域

BLAST basic local alignment search tool	基本的局部对比检索工具
BLOTTO bovine lacto transfer technique optimizer	牛乳转移技术优化液
BPDS bathophenarthroline disulfonate	红菲绕啉二磺酸
BSA borine serum albnmin	牛血清白蛋白
CAPS 3-［cyclohexylamino］-1-propanesulfonic acid	3-［环己基氨基］-1-丙烷磺酸
CBB coomassie brilliant blue	考马斯亮兰
CCC cation-chloride cotransporter	氯离子共转运蛋白
CEN Centromere	着丝粒
CM complete minimal dropout medium	完全极限省却成分培养基
CPM（S） count per minute（second）	每分钟（秒）计数
CTAB cetyltrime thylammonium bromide	十六烷基三甲基溴化铵
CTR1 Copper transport	铜转运蛋白
DDBJ DNA data bank of Japan	日本 DNA 数据库
2DE two-dimentional electrophoresis	双向电泳
DEPC diethylpyrocarbonate	焦碳酸二乙酯
DIG digoxin	地高辛
DMSO dimethyl sulfoxide	二甲基亚砜
dNTP dATP dTTP dCTP dGTP mix	脱氧核糖核苷三磷酸
DTT 1，4-dithiothreitol	二硫苏糖醇
EB ethidium bromide	溴化乙锭
EDTA ethylenediamine tetra acetate	四乙酸乙二铵
ELISA enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附测定
EMBL Euroupe molecular biological labrary	欧洲分子生物学实验室
FDR3 Fe-deficiency-related clone	缺铁相关克隆
FET3 Fe^{2+}-transport	Fe（Ⅱ）转运基因
Frd Ferric-chelate reductase-deficient	三价铁螯和物的还原酶缺损突变
FRE Ferric reductase	Fe（Ⅲ）还原酶
Geiger	放射性计数器
GenBank	核酸数据库
GIT guanidinium isothiocyanate	异硫氰酸胍
Gly glycine	甘氨酸
HCG human chorionic gonadotropin	人绒毛膜促性腺激素
HGP human genomics project	人类基因组计划
HEPES N-2-hydroxyethylpiperazine-n′-2-ethanesulfonic acid	N-2-羟乙基哌嗪-N′-2-乙磺酸
HPCE high performance capillary electrophoresis	高效毛细管电泳
HRP horseradish peroxodase	辣根过氧化物酶
*Ids*1 iron deficiency specific gene，No. 1	1 号缺铁专一基因
HTML hypertext markup language	超文本标记语言

http　hypertext transfer protocol	超文本传输协议
Ids2　iron deficiency specific gene, No. 2	2 号缺铁专一基因
IEF　isoelectric focusing	等电聚焦
IPTG　isopropyl-1-thio-β-D-galuctoside	异丙基-硫代-β-D-半乳糖苷
IRT　iron regulated transporter	调节铁转运蛋白
Km　kanamycin	卡那霉素
LB　Luria-Bertani	LB 培养基
MAC　metal binding activator	金属结合激活子
MCS　multiple cloning sites	多克隆位点
MOPS　3-N-morpholino-propane sulfonic acid	3-N 吗啉代-丙磺酸
MRE　metal response element	金属反应元件
NBT　nitroblue tetrazolium	硝基蓝四氮唑
PAGE　polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PEG　polyethylene glycol	聚乙二醇
PCR　polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PM　plasma membrane	质膜
PMSF　phenylmethyl sulfonyl fluoride	苯甲基磺酰醇
PVDF　polyvinylidene difluoride Film	聚偏二氟乙烯膜
PVP　polyvinyl pyrrolidone	聚乙烯吡咯烷酮
RACE　rapid amplification of cDNA ends	cDNA 末端快速扩增
rpm　rotor per minute	每分钟转速
RT-PCR　reverse trascription polymerase chain reaction	逆转录聚合酶链式反应
SAM　Sadenosylmethionine	S-腺苷甲硫氨酸
S-D　sequence Shine-Dalgarno sequence	S-D 序列
SDS　sodium dodecyl benzene sulfonate	十二烷基磺酸钠
SFD　Suppressor of ferrous uptake defect	大麦铁吸收缺陷的抑制子
SLS　N-lauroylsarcosine sodium	十二烷基肌氨酸钠
TCA　trichloroacetic acid	三氯乙酸
TEL　telomere	端粒
TEMED　N, N, N′, N′-tetramethyl ethlenediamine	四甲基乙二胺
Tris　trishydroxymethlaminomethane	三羟甲基氨基甲烷
www　world wide web	万维网
X-gal（5-hromo-4-chliro-3-indolyl-β-D galactoside）	5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D 半乳糖苷
YAC　yeast artificial chromosome	酵母人工染色体
YNB　yeast nitrogen base	酵母基本氮源（无氨基酸或硫酸氨）
YPD　yeast/peptone/dextrose（media）	酵母提取物/蛋白胨/葡萄糖（培养基）
ysl　yellow stripel	玉米 Fe（Ⅲ）吸收转运体的缺失突变
ZIP　ZRT/IRT protein	真核生物 Zn/Fe 转运相关蛋白